

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**PAPEL DE LAS CERAMIDAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA Y LA
INDUCCIÓN DE CONDUCTA SIMILAR A LA ANSIEDAD EN RATONES**

Por

Diana Sofía Bernal Vega

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

Octubre 2025

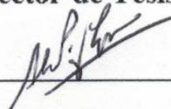
**PAPEL DE LAS CERAMIDAS EN LA ACTIVACION DE LA MICROGLIA Y LA
INDUCCION DE CONDUCTA SIMILAR A LA ANSIEDAD EN RATONES**

Aprobación de la Tesis:



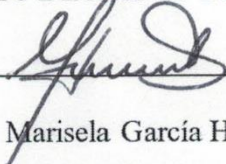
Dr. C. Alberto Camacho Morales

Director de Tesis



Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya

Co-Director de Tesis



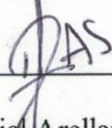
Dra. C. Marisela García Hernández

Miembro de la Comisión



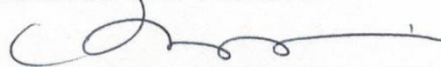
Dra. C. Aurora de Jesús Garza Juárez

Miembro de la Comisión



Dr. C. Daniel Arellanos Soto

Miembro de la Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

LUGAR DE TRABAJO

El proyecto se desarrolló en la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, dentro del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y la Unidad de Neurometabolismo del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud. En colaboración con el Laboratorio de Investigación en Neurociencias del Hospital Infantil de México Federico Gómez, el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, y el Institute for Obesity Research de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías de (CONAHCYT) para Diana Sofía Bernal-Vega (Número de Beca: 814364)

PAPEL DE LAS CERAMIDAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA Y LA INDUCCIÓN DE CONDUCTA SIMILAR A LA ANSIEDAD EN RATONES

Proyecto revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León con número de registro BI23-00001.

DERECHOS RESERVADOS© PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Trastornos de Ansiedad.....	3
2.2 Ceramidas	5
2.3 Funciones biológicas de las ceramidas en el sistema nervioso central.	9
2.4 Alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos en diversas patologías humanas	10
2.5 Contribución de las ceramidas en los trastornos de ansiedad	11
2.6 Activación inmunológica y neuroinflamación en la fisiopatología de trastornos psiquiátricos	13
2.7 Ceramidas como potenciales moduladores de la neuroinflamación	16
2.8 Ceramidas y homeostasis mitocondrial	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos específicos.....	22
6. METODOLOGÍA.....	23
6.1. Estrategia experimental	23
6.2 Animales de laboratorio	24
6.3 Administración de ceramidas	24
6.4 Pruebas conductuales.....	25
6.4.1 Laberinto elevado.....	25
6.4.2 Campo abierto.....	26
6.4.3 Prueba de caja de luz y oscuridad.....	26
6.4.4 Prueba de alimentación novedosa suprimida	27
6.4.5 Cálculo del Z-score de emocionalidad.....	27
6.5 Aislamiento de células microgliales	28
6.5.1 Sacrificio y disección.....	28
6.5.2 Disociación enzimática.....	29
6.5.3 Gradientes de Percoll™ para aislamiento de microglía	29
6.5.4 Obtención de células microgliales por gradiente de densidad	29
6.5.5 Fenotipificación de la microglía.....	30

6.6	Análisis <i>in vitro</i>	30
6.6.1	Mantenimiento de la línea celular SIM-A9.....	30
6.6.2	Cultivo de microglía en placa.....	31
6.6.3	Ensayo de fagocitosis.....	31
6.6.4	Análisis de Expresión de genes proinflamatorios	32
6.6.5	Determinación del potencial de membrana mitocondrial en microglía	33
6.6.6	Cuantificación de especies reactivas de oxígeno citosólicas y mitocondriales en la microglía.....	34
6.7	Análisis lipidómico y perfil inflamatorio en plasma de sujetos con ansiedad	34
6.7.1	Recolección de muestras y evaluación clínica.....	34
6.7.2	Criterios de inclusión y exclusión.....	35
6.7.3	Cuantificación de citocinas	35
6.7.4	Cuantificación de ceramidas.....	36
6.8	Análisis estadístico	37
7.	RESULTADOS.....	38
7.1	Los ratones hembra administradas con ceramidas presentan una conducta similar a la ansiedad.....	38
7.2	Las ceramidas modulan la activación microglial en la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado de ratones hembra con conducta similar a la ansiedad.	43
7.3	La activación microglial M1 en corteza muestra una asociación inversa con la conducta tipo ansiosa en el grupo expuesto a las ceramidas.	45
7.4	La estimulación con ceramidas de cadena larga aumenta la actividad fagocítica de la microglía <i>in vitro</i>	46
7.5	La estimulación con ceramidas de cadena larga y muy larga promueven la expresión de genes inflamatorios <i>in vitro</i>	47
7.6	La estimulación con ceramidas reduce el potencial de membrana mitocondrial y aumenta las especies reactivas de oxígeno citosólicas.....	48
7.7	Características de la población de estudio.	49
7.8	Los sujetos con trastorno de ansiedad presentan un perfil proinflamatorio sistémico.	50
7.9	El perfil lipidómico plasmático en sujetos con ansiedad muestra disminución en diacilgliceroles, lisofosfatidilcolina y triglicéridos.	51
7.10	Las concentraciones plasmáticas de ceramidas no se asocian con el puntaje de ansiedad. .	53
8.	DISCUSIÓN	57
9.	CONCLUSIONES.....	66
10.	PERSPECTIVAS.....	67
11.	BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las ceramidas.	6
Figura 2. Rutas para la síntesis de ceramida.	8
Figura 3. Esquematización de la estrategia experimental.	23
Figura 4. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en el laberinto elevado.	38
Figura 5. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en la prueba de campo abierto	39
Figura 6. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en la caja de luz/oscuridad.	40
Figura 7. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en la prueba de alimentación suprimida novedosa.	41
Figura 8. El tratamiento con ceramidas induce un fenotipo ansioso consistente en múltiples pruebas conductuales en las hembras administradas con ceramidas	42
Figura 9. El tratamiento con ceramidas modifica el estado de activación de las células microgliales en hembras	44
Figura 10. Relación entre la proporción de microglía M1 (CD86⁺) en corteza prefrontal y la conducta tipo ansiosa en la prueba de laberinto elevado	45
Figura 11. La estimulación con ceramidas aumenta la actividad fagocítica de la línea celular de microglía SIM-A9	46
Figura 12. La estimulación con ceramidas incrementa la expresión de genes proinflamatorios en la línea celular de microglía SIM-A9.	48
Figura 13. La estimulación con ceramidas promueve una pérdida del potencial de	

membrana mitocondrial y estrés oxidativo en la línea de microglía SIM-A9.	49
Figura 14. Alteración en el perfil de citocinas plasmáticas en sujetos con trastorno de ansiedad.....	51
Figura 15. Perfil de ceramidas y sus derivados en plasma de sujetos con trastorno de ansiedad y controles sanos	52
Figura 16. Sujetos con ansiedad presentan niveles elevados de diglicéridos, lisofosfatidilcolina y triglicéridos plasmáticos	53
Figura 17 Relación entre las concentraciones plasmáticas de ceramidas y el puntaje de ansiedad en sujetos con trastorno de ansiedad y controles sanos.	54
Figura 18. El fenotipo ansioso no muestra asociación significativa con especies lipídicas plasmáticas diferencialmente expresadas.	55

NOMENCLATURA

3KDSR	3-cetoesfingánina reductasa dependiente de NADH
AC	Ceramidasa ácida
ACER2	Ceramidasa alcalina 2
Arg1	Arginasa-1
ASM	Esfingomielinasa ácida
BAI	Inventario de Ansiedad de Beck
BSA	Albúmina sérica bovina
C1P	Ceramida-1-fosfato
CDase	Ceramidasa
CE	Dihidroceramida
Cer	Ceramida
CERK	Ceramida quinasa
CerS	Ceramida sintasa
CGI-S	Escala de Impresión Clínica Global
DCM	Diclorometano
DDase	Dihidroceramida desaturasa
DG	Diacilglicerol
EPM	Laberinto en cruz elevado
FA	Ácido graso
GAD-7	Escala de Ansiedad Generalizada de 7 ítems
GCS	Glucosilceramida sintasa
GCase	Glucosilceramidasa

HAM-A	Escala de ansiedad de Hamilton
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HexCER	Hexosilceramida
HIP	Hipocampo
Iba1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
INF- α	Interferón alfa
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IL	Interleucina
LacCER	Lactosilceramida
LDB	Caja de luz/oscuridad
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolisacárido
MCPI	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
NC	Ceramidasa neutra
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NLRP3	Receptor tipo NOD con dominio de pirina 3
NSF	Alimentación suprimida novedosa
NSM	Esfingomielinasa neutra
OF	Campo abierto
PFC	Corteza prefrontal
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S1P	Esfingosina-1-fosfato
S1PL	Liasa de esfingosina-1-fosfato

SK	Esfingosina quinasa
SMase	Esfingomielinasa
SMS	Esfingomielina sintasa
SNC	Sistema nervioso central
SPP	Esfingosina-1-fosfato fosfatasa
SPT	Serina palmitoiltransferasa
STAI	Inventario de Ansiedad estado-rasgo
TAG	Trastorno de ansiedad generalizada
TDM	Trastorno depresivo mayor
TG	Triglicérido
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TREM2	Receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2

RESUMEN

Los trastornos de ansiedad son una de las principales problemáticas de salud mental, caracterizados por miedo y preocupación persistente, con un alto impacto social y clínico. Su fisiopatología involucra factores neurobiológicos, metabólicos e inmunológicos, destacando las ceramidas por su rol en apoptosis, metabolismo energético, inflamación y función mitocondrial. Este estudio evaluó ceramidas de cadena larga y muy larga (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1) en la modulación de un fenotipo ansioso, la activación microglial y la función mitocondrial. En el modelo murino, la administración sistémica de ceramidas indujo conductas ansiosas dependientes del sexo, con mayor susceptibilidad en hembras, promoviendo un fenotipo microglial proinflamatorio, aumento de fagocitosis y expresión de genes inflamatorios (NLRP3, TNF- α), así como alteraciones mitocondriales. En plasma humano, se observó un estado proinflamatorio (IL-6, MCP1, TNF- α elevados; IL-17A reducido) sin cambios en ceramidas, pero con disminución de diglicéridos, lisofosfatidilcolinas y triglicéridos, sugiriendo que las alteraciones lipídicas no se limitan a la vía de las ceramidas. En conjunto, los resultados apoyan un eje lípidos-inmunidad como componente central en la ansiedad y destacan la importancia de explorar un espectro lipídico más amplio para futuras estrategias diagnósticas y terapéuticas.

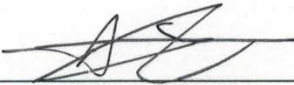


Dr. C. Alberto Camacho Morales

Director de Tesis

ABSTRACT

Anxiety disorders are among the leading mental health problems, characterized by persistent fear and worry, with high social and clinical impact. Their pathophysiology involves neurobiological, metabolic, and immunological factors, with ceramides playing a significant role in apoptosis, energy metabolism, inflammation, and mitochondrial function. This study evaluated the modulation of an anxious phenotype, microglia activation and mitochondrial function by long- and very-long-chain ceramides (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0, and C24:1). In the murine model, systemic administration of ceramides induced sex-dependent anxiety-like behaviors, with females showing greater susceptibility, promoting a pro-inflammatory microglial phenotype, increased phagocytosis, and expression of inflammatory genes (NLRP3, TNF- α), as well as mitochondrial alterations. In human plasma, a pro-inflammatory state was observed (elevated IL-6, MCP1, TNF- α ; reduced IL-17A) without changes in ceramides, but with decreased diglycerides, lysophosphatidylcholines, and triglycerides, suggesting that lipid alterations are not limited to the ceramide pathway. Taken together, these findings support a lipid-immunity axis as a central component in anxiety and highlight the importance of exploring a broader lipid spectrum for future diagnostic and therapeutic strategies.



Dr. C. Alberto Camacho Morales

Director de Tesis

1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos de ansiedad se caracterizan por presentar miedo y/o preocupación persistente a situaciones o eventos cotidianos. Se conoce que los factores de riesgo para el desarrollo de ansiedad se incluyen al estrés, la herencia, consumo de drogas alcohol e incluso exposición a eventos adversos durante el desarrollo fetal. Desde el punto de vista neurobiológico se propone que la deficiencia de monoaminas, alteraciones gliales, cambios neuroanatómicos, neuroinflamación (particularmente la activación microglial), disfunción mitocondrial y alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos, son contribuyentes etiológicos de los trastornos de ansiedad (Mishra & Varma, 2023). De interés, tanto la evidencia clínica como la obtenida en modelos animales confirma una asociación entre los niveles de ceramidas en plasma y la sintomatología de la ansiedad (Brazdis et al., 2024; Demirkan et al., 2013; Mühle et al., 2013).

Las ceramidas son moléculas orgánicas que están formadas por la unión de un ácido graso a la esfingosina mediante un enlace de tipo amida. Los componentes de ácidos grasos de las ceramidas varían de 14 a 26 átomos de carbono. Actualmente no están completamente identificados los mecanismos moleculares y/o celulares que inducen el incremento de ceramidas en sujetos con ansiedad, así como los blancos celulares y/o moleculares de las ceramidas para promover el desarrollo de los trastornos de ansiedad en humanos. Sin embargo, se sabe que las ceramidas regulan la apoptosis, las respuestas al estrés, el metabolismo y la inflamación (Honn & Zeldin, 2019). A nivel cerebral desempeñan un papel clave en la activación de células microgliales (Scheiblich et al., 2017; Sikora et al., 2017; Teo et al., 2023) y participan en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Ding et al., 2024).

En nuestro laboratorio, se ha determinado que la programación materna por exposición a nutrientes con alta densidad energética (alta proporción en grasa y azúcar) promueve en la descendencia de ratas y ratones, el aumento de la concentración de ceramidas de cadena larga

(Camacho-Morales et al., 2024), e importantemente el desarrollo de un fenotipo similar a la ansiedad (Trujillo-Villarreal et al., 2024). Además, hemos reportado que la ceramida C24:0 induce la acumulación de C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C20:0, C22:0, C22:1, C24:0, C24:1, C25:0, C26:0, y C26:1 y disfunción mitocondrial en hepatocitos (Camacho-Morales et al., 2024). A partir de estos antecedentes, la evidencia indica una asociación entre las ceramidas y el deterioro metabólico en tejidos clave para el control energético; no obstante, se desconoce si el aumento en su concentración constituye una causa, una consecuencia o un factor contribuyente en el desarrollo de la conducta ansiosa.

Por lo anterior, proponemos que las ceramidas coordinan una interacción mutua entre la función mitocondrial y la inflamación, que potencialmente podría contribuir al desarrollo de una conducta similar a la ansiedad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Trastornos de Ansiedad

La ansiedad es un estado de inquietud y alerta que surge en ausencia de una amenaza inmediata y suele ir acompañado de manifestaciones somáticas, conductuales y cognitivas. La frecuencia e intensidad con la que cada individuo experimenta ansiedad varía considerablemente a lo largo de la vida. Mientras que algunas personas logran mantener la calma ante diversas situaciones, otras presentan respuestas exacerbadas al estrés y una mayor predisposición a enfocarse en estímulos potencialmente amenazantes. Esta tendencia persistente se conoce como un ‘rasgo’ de ansiedad. Un rasgo de ansiedad elevado se asocia con un mayor riesgo de desarrollar diversas psicopatologías, incluidos los trastornos de ansiedad. Las personas pueden enfrentar desafíos con calma o mostrar una mayor sensibilidad al estrés y una atención sesgada hacia estímulos que podrían percibirse como amenazantes. Esta disposición persistente se denomina ‘rasgo’ de ansiedad. Tener un rasgo de ansiedad elevado se considera un factor de riesgo para el desarrollo de diversas psicopatologías, incluidas los trastornos de ansiedad y la depresión (Skapinakis, 2023).

La ansiedad se considera un mecanismo de adaptación evolutiva, ya que el estado de alerta que se desencadena puede proteger a los individuos de peligros potenciales. Sin embargo, cuando las respuestas asociadas a la ansiedad son excesivas, esta se vuelve patológica y puede manifestarse en una variedad de trastornos. La ansiedad patológica, reflejada en la alta prevalencia de los trastornos de ansiedad, constituye el problema de salud mental más común, con una prevalencia de por vida superior al 20%, representando una carga significativa tanto para las personas como para los sistemas de salud y la economía (Javaid et al., 2023).

Los trastornos de ansiedad son un grupo de afecciones caracterizadas por miedo o preocupación excesiva, que se vuelve persistente y pueden interferir con las actividades cotidianas.

Se define como un estado de intranquilidad y alerta elevada que ocurre incluso en ausencia de una amenaza directa, acompañado de respuestas de estrés a nivel fisiológico y conductual. Constituyen uno de los grupos de trastornos mentales más relevantes a nivel mundial, afectando a aproximadamente 264 millones de personas, de acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud. Dentro de estos se incluyen el trastorno de ansiedad generalizada, trastornos de pánico, trastorno de ansiedad por separación, y fobias. Centrándonos en los trastornos de ansiedad generalizada (TAG), estos se caracterizan por una ansiedad y preocupación excesivas por una serie de acontecimientos o actividades, que al individuo le resulta difícil controlar. La preocupación afecta a diversos contextos como el laboral, doméstico y social. Entre los síntomas necesarios para el diagnóstico se incluyen la sensación de inquietud, la fatiga fácil, la dificultad para concentrarse o la mente en blanco, la irritabilidad, la tensión muscular y los trastornos del sueño. Este tipo de ansiedad presenta una alta tasa de comorbilidad con el trastorno de depresión mayor (TDM) que oscila entre el 40% y el 98% en los estudios de tratamiento. De hecho, la comorbilidad TAG/TDM puede darse con más frecuencia que el TDM o el TAG por sí solos (Kalin, 2020).

Entre los factores que aumentan el riesgo a desarrollar un trastorno de ansiedad se encuentran: trauma, estrés, depresión, consumo de drogas y alcohol, antecedentes familiares de ansiedad y afecciones de salud física. De interés para el presente proyecto, los trastornos de ansiedad pueden tener sus orígenes en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. En este sentido, la exposición a estímulos o factores ambientales adversos durante periodos críticos del desarrollo (programación fetal), tales como infecciones, estrés, sobrenutrición, entre otros, aumentan el riesgo de desarrollar trastornos psiquiátricos, incluidos los trastornos de ansiedad en la etapa adulta (Faa et al., 2016).

Las bases neurobiológicas de los trastornos de ansiedad no se conocen completamente. Se

tiene evidencia de que la interacción entre factores psicológicos, ambientales y biológicos contribuye al desarrollo de ansiedad. Entre los factores biológicos se han descrito anomalías neuroanatómicas, factores neuroquímicos, y anomalías neuroendocrinas del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (Grogans et al., 2023). Recientemente, los esfingolípidos han sido propuestos como uno de los metabolitos que participan en la patología de los trastornos del estado de ánimo (Brodowicz et al., 2018; Schneider et al., 2017). Evidencia experimental ha confirmado que cambios en la homeostasis de los lípidos en el cerebro, incluyendo a los fosfolípidos, lípidos endocannabinoides y esfingolípidos es capaz de modular las funciones mentales (Schneider et al., 2017). En este contexto, datos experimentales de nuestro laboratorio empleando modelos murinos han confirmado que la exposición a nutrientes con alto valor energético durante la programación fetal induce aumento en las concentraciones plasmáticas de ceramidas de cadena larga, y la presencia de una conducta similar a la ansiedad en la descendencia. Estas evidencias proponen el papel potencial de las ceramidas en el desarrollo de ansiedad en modelos murinos.

2.2 Ceramidas

Las ceramidas son una familia de lípidos bioactivos compuestas por una base de cadena larga esfingoide unida a una cadena de acilo a través de un enlace amida (Figura 1), se diferencian entre sí por la longitud, la hidroxilación y la saturación tanto de la base esfingoide como de los ácidos grasos que la componen. Las bases esfingoides son de tres tipos químicos generales: esfingosina, dihidroesfingosina y fitoesfingosina. Con base en la naturaleza del esqueleto de la base esfingoide, se distinguen tres subgrupos principales en la familia de las ceramidas: el compuesto llamado ceramida contiene esfingosina, que tiene un doble enlace trans en la posición C4-5 en el esqueleto de la base esfingoide y la dihidroceramida, el precursor inactivo de la ceramida contiene

esfinganina, que presenta un esqueleto esfingoide saturado desprovisto del doble enlace 4,5-trans. Los ácidos grasos de las ceramidas varían ampliamente en composición, pero típicamente son largos. Las longitudes de sus cadenas de acilo varían de 14 a 26 átomos de carbono, aunque los ácidos grasos más comunes son los ácidos grasos no hidroxilados que incluyen al palmítico y esteárico (Yoshio Hirabayashi et al., 2006).

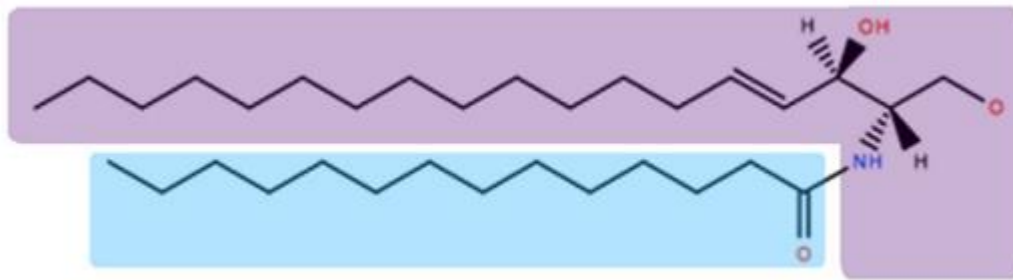


Figura 1. Estructura de las ceramidas. Las ceramidas se componen de un ácido graso unido (azul) mediante un enlace amida a una esfingosina (morado), un alcohol insaturado de 18 carbonos.

Las ceramidas se pueden producir en las células a partir de tres vías esenciales; la vía *de novo*, la vía de rescate y la vía de la esfingomielina (Figura 2). El metabolismo de las ceramidas es altamente complejo y está sujeto a una regulación estricta mediada por enzimas clave como la ceramida sintasa (CerS), las ceramidasa (CDase) y las esfingomielinasas (SMase), las cuales presentan interacciones específicas con orgánulos celulares incluyendo mitocondrias, membrana plasmática, lisosomas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. La síntesis *de novo* de esfingolípidos comienza con la condensación de L-serina y un ácido graso activado como palmitoil-CoA, miristoil-CoA o estearoil-CoA en el retículo endoplásmico, catalizada por la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT), lo que genera 3-cetoesfinganina, la cual es posteriormente reducida a dihidroesfingosina por la 3-cetoesfinganina reductasa dependiente de NADH (KDSR). Las ceramida sintasas catalizan la acilación de la dihidroesfingosina para formar

dihidroceramida, existiendo seis isoformas con especificidad selectiva según la longitud de la cadena de acilo: CerS1 utiliza C18, CerS2 actúa sobre cadenas muy largas como C22–C24, CerS3 sobre C26, CerS4 sobre C18–C20 y CerS5 y CerS6 sobre C14–C16. La distribución tisular de estas isoformas también es específica: CerS1 se expresa principalmente en el cerebro, CerS2 en hígado y riñón, CerS3 en testis y piel, CerS4 en piel, corazón, hígado y leucocitos, CerS5 en epitelio pulmonar y cerebro, y CerS6 en intestino. Finalmente, la ceramida se genera a partir de la dihidroceramida mediante la acción de la dihidroceramida desaturasa (DDase) (Bernal-Vega et al., 2023).

Adicionalmente, las ceramidas pueden formarse a través de la vía de rescate, en la cual se generan a partir de la degradación parcial de glicolípidos de membrana por la glucosilceramidasa (GCase), o mediante la vía de la esfingomielina, donde los esfingolípidos se hidrolizan en lisosomas por acción de las esfingomielinasas. Posteriormente, la ceramida es transportada al complejo de Golgi mediante mecanismos vesiculares y no vesiculares dependientes de ATP, permitiendo la síntesis de esfingolípidos complejos. La ceramida puede seguir cuatro rutas catabólicas principales: (1) fosforilación por la ceramida quinasa (CERK) para formar ceramida-1-fosfato (C1P), (2) incorporación a esfingomielina por la esfingomielina sintasa (SMS), (3) incorporación a glucosilceramida mediante la glucosilceramida sintasa (GCS) para generar cerebrósidos, gangliósidos, sulfatidos y globósidos, o (4) desacilación por ceramidasa para producir esfingosina, que posteriormente puede ser fosforilada por esfingosina quinasa (SK) para generar esfingosina-1-fosfato (S1P), degradada por la esfingosina-1-fosfato fosfatasa (SPP) o la S1P liasa (Bernal-Vega et al., 2023).

Debido a estas características y complejas interacciones, se ha demostrado que las ceramidas poseen una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo la regulación del crecimiento, diferenciación, muerte y senescencia celular, así como la autofagia y la modulación

de procesos inflamatorios (Futerman, 2016).

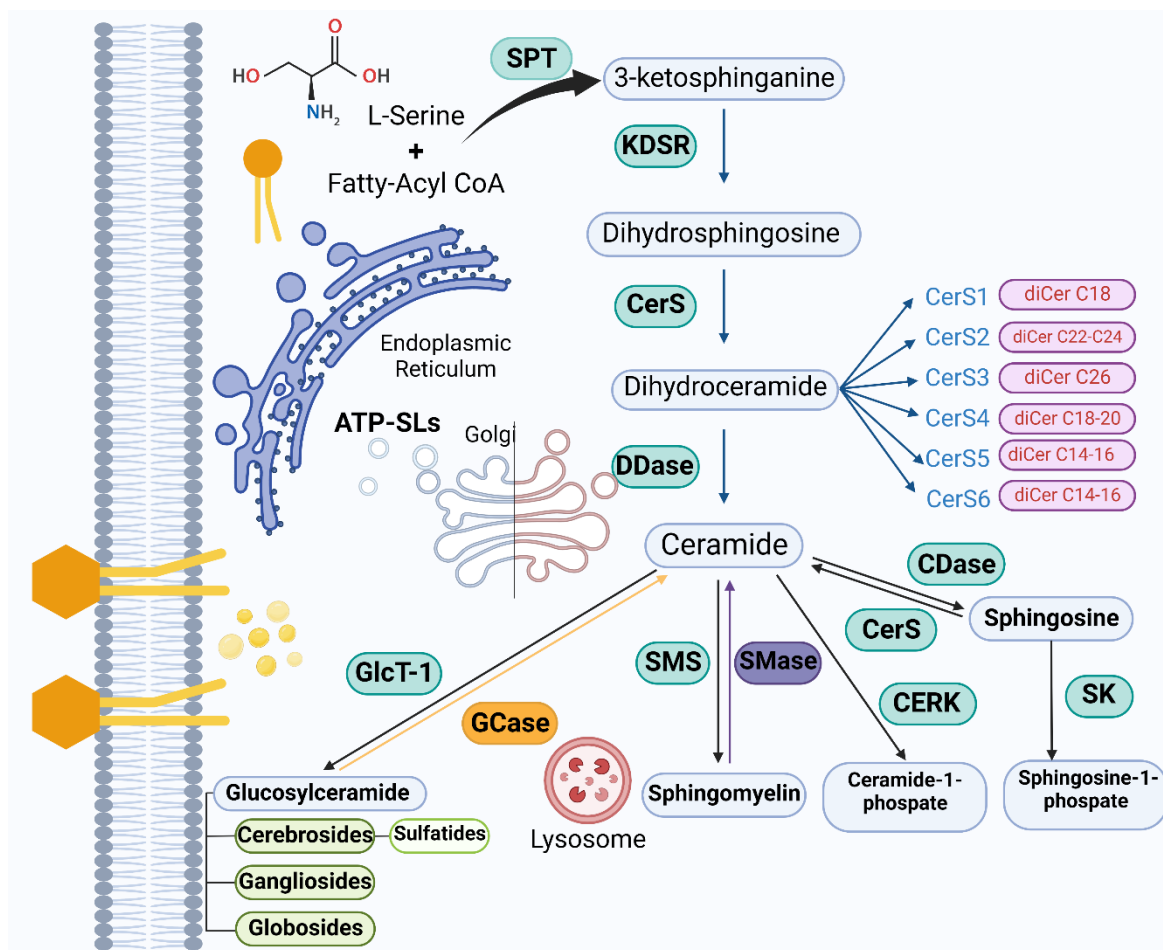


Figura 2. Rutas para la síntesis de ceramida. El diagrama esquematiza la síntesis de la ceramida a través de la vía de novo, de rescate y de la esfingomielina.

En el sistema nervioso central, la versatilidad metabólica de las ceramidas adquiere una relevancia particular ya que las ceramidas como sus metabolitos derivados participan en la regulación de la homeostasis celular, la plasticidad sináptica, la supervivencia neuronal y la respuesta neuroinflamatoria (Jamjoum et al., 2024), por lo que alteraciones en su metabolismo se han asociado con la disfunción de procesos neurobiológicos clave, lo que sugiere un papel relevante en la fisiopatología de trastornos neurológicos y psiquiátricos (Tringali & Giussani, 2022). Estas

evidencias han impulsado un creciente interés en el estudio de los esfingolípidos bioactivos dentro del contexto del sistema nervioso central.

2.3 Funciones biológicas de las ceramidas en el sistema nervioso central.

A lo largo de las últimas tres décadas, múltiples estudios han contribuido a esclarecer las funciones biológicas de los principales esfingolípidos bioactivos. Estas investigaciones han sido fundamentales para caracterizar su papel en la señalización intracelular y en la regulación de diversas respuestas fisiológicas. Entre ellos, la ceramida, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato (S1P) han sido ampliamente estudiadas, permitiendo elucidar sus rutas metabólicas, mecanismos de regulación y funciones en distintos procesos celulares (Ventura et al., 2019).

En particular, las ceramidas actúan como segundos mensajeros en diversas cascadas de señalización, modulando la actividad de proteínas clave como la proteína quinasa $C\zeta$, la fosfolipasa A2, la catepsina D, las quinasas Jun-N-terminales, c-Raf-1, proteínas G como Ras y Rac, y quinasas tipo Src. Estas interacciones influyen en procesos esenciales como la apoptosis, la diferenciación celular, la senescencia y la respuesta inflamatoria (Bernal-Vega et al., 2023).

Además, se ha observado que las ceramidas participan en la plasticidad sináptica al regular la localización y el tráfico de receptores en sitios postsinápticos. Componentes como la esfingomielina, la ceramida, el colesterol y el gangliósido GM1 conforman balsas lipídicas, microdominios especializados de la membrana que desempeñan un papel crucial en la señalización. Estas estructuras permiten la compartimentalización de proteínas de membrana en unidades activas de señalización y facilitan la integración de distintas rutas de transducción (Bernal-Vega et al., 2023).

Adicionalmente, se ha reportado que los cambios en las especies de esfingolípidos presentes en la membrana plasmática pueden coordinar el equilibrio de la señalización de

neurotransmisores, modulando tanto su captación como su liberación. Un ejemplo destacado es la generación de ceramida mediante la activación de la esfingomielinasa neutra-2 (nSMase2), inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Este mecanismo favorece la fusión de vesículas con la membrana plasmática, lo que facilita la inserción de receptores NMDA y potencia las corrientes postsinápticas excitatorias (Wheeler et al., 2009).

Por otro lado, niveles elevados de ceramidas han sido asociados con procesos patológicos en el SNC. Se ha demostrado que pueden inducir apoptosis neuronal mediante la despolarización mitocondrial, la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, contribuyendo así a la neurodegeneración. Asimismo, las ceramidas pueden modular la respuesta inflamatoria glial al promover la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, exacerbando cuadros de neuroinflamación (Leal et al., 2022).

En conjunto, estas evidencias subrayan que las ceramidas no solo desempeñan funciones estructurales en el SNC, sino que también actúan como mediadores bioactivos con implicaciones críticas en la homeostasis neuronal y en la fisiopatología de enfermedades neurológicas. Su papel en la señalización celular, la plasticidad sináptica, la neurogénesis y la respuesta inflamatoria las posiciona como elementos clave en la salud y enfermedad cerebral.

2.4 Alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos en diversas patologías humanas

Los esfingolípidos fueron identificados hace más de un siglo y, durante gran parte de ese tiempo, se consideraron únicamente componentes estructurales de las membranas biológicas. En la actualidad, se reconoce que muchas de estas moléculas poseen una alta actividad biológica, participando en la transducción de señales y en la regulación de múltiples procesos celulares. La ceramida, molécula central en la estructura y el metabolismo de los esfingolípidos, es el miembro

más estudiado de esta familia y actúa como precursor de otros lípidos bioactivos, como la ceramida-1-fosfato, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato (Quinville et al., 2021). La investigación en las últimas dos décadas ha demostrado que los esfingolípidos modulan procesos como la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, así como la respuesta inmune y al estrés. La ceramida también se ha propuesto como mediador potencial en la resistencia a la insulina en músculo y en fenómenos de lipotoxicidad. Más recientemente, se ha destacado su participación en la patogénesis del cáncer, disfunción cardíaca, lesión por isquemia/reperfusión, diabetes tipo 2, obesidad, aterosclerosis e incluso enfermedades psiquiátricas (Green et al., 2021).

En el SNC, los esfingolípidos no solo cumplen funciones estructurales, sino que participan activamente en la señalización celular y en la regulación de la respuesta neuroinmune. Su capacidad para modular vías inflamatorias, influir en la viabilidad neuronal y alterar la comunicación sináptica ha despertado un creciente interés en su posible contribución a la fisiopatología de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos, en particular de la ceramida, se han asociado con procesos de neuroinflamación y disfunción sináptica, fenómenos que se consideran ejes centrales en diversos trastornos del estado de ánimo, incluyendo la depresión y ansiedad. Estos hallazgos han impulsado la hipótesis de que un desequilibrio en el perfil de esfingolípidos podría favorecer mecanismos patológicos subyacentes a trastornos del estado de ánimo (Mühle et al., 2013; Narayan, 2011).

2.5 Contribución de las ceramidas en los trastornos de ansiedad

Durante las últimas décadas, el estudio de factores neurobiológicos asociados a la patofisiología de los trastornos de ansiedad ha documentado la participación de trastornos metabólicos. Algunos estudios clínicos han subrayado la importancia de la vía de las ceramidas en la patogénesis de esta enfermedad, por ejemplo, los análisis de plasma de pacientes con síntomas

depresivos/ansiosos muestran un aumento del nivel de ceramidas C20:0 y C22:0, además de un aumento en la actividad de la esfingomielinasa en comparación con controles sanos (Demirkan et al., 2013), independiente del uso de medicamentos antidepresivos/ansiolíticos. En pacientes con enfermedad de la arteria coronaria en los cuales la ansiedad es una comorbilidad prevalente, se ha descrito una correlación negativa entre la concentración en plasma de ceramida C18:0, C18:1, C20:0 y C22:0 y el puntaje en el Inventario de Ansiedad Estado-Rasgo (STAI, del inglés *State-Trait Anxiety Inventory*) (Rovinski, 2013), sugiriendo que a mayor concentración de ceramida en plasma mayor rasgo de ansiedad.

Evidencia en estudios preclínicos empleando modelos murinos ha confirmado el efecto de las ceramidas en la regulación de conducta semejante a ansiedad. Por ejemplo, la deficiencia de la ceramida sintasa 1 (CerS1) en el cerebro decrece la concentración de C16:0, C20:0, C22:0 y C24:0 cerebral, y atenúa la conducta similar a la ansiedad (Ginkel et al., 2012). En este contexto, la inhibición de la esfingomielinasa ácida (ASM) en el hipocampo de ratones reduce la concentración de ceramidas y revierte el comportamiento de tipo depresivo y ansioso (Mühle et al., 2013). De interés, aumento de la actividad de ASM, esfingomielinasa neutra (NSM), ceramidasa ácida (AC) y neutra (NC) se ha identificado en múltiples regiones cerebrales asociadas a comportamientos depresivos/ansiosos tales como el hipotálamo, el hipocampo ventral, mesencéfalo ventral y dorsal (Zoicas, Schumacher, et al., 2020). Además, se ha observado una fuerte correlación entre el comportamiento similar a la ansiedad y la actividad de ASM en la amígdala, el hipocampo ventral y el mesencéfalo dorsal en ratas hembra criadas selectivamente para un mostrar un comportamiento similar a la ansiedad alto (Zoicas, Schumacher, et al., 2020). De manera notoria, la infusión de la C16:0 en la amígdala basolateral es capaz de inducir un fenotipo de tipo ansiogénico en ratones (Zoicas, Huber, et al., 2020). Se han reportado niveles plasmáticos aumentados de ceramidas C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1 en modelos murinos de conducta similar a la ansiedad

inducida por estrés y la neutralización con anticuerpos contra ceramidas anula el fenotipo de ansiedad. Además, los autores inyectaron plasma cargado de ceramidas en ratones sanos a una concentración cinco veces mayor que la encontrada en los ratones estresados y observaron que el plasma rico en ceramidas inducía un comportamiento similar a la ansiedad dentro de las primeras 24 horas (Schumacher, Edwards, et al., 2022). Estos estudios sugieren la contribución del metabolismo de esfingolípidos en la regulación del comportamiento de ansiedad, sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales los lípidos contribuyen a la fisiopatología de la ansiedad siguen sin esclarecerse por completo.

Diversos estudios han analizado el efecto de las ceramidas en la regulación de vías de señalización proinflamatorias (Albeituni & Stiban, 2019). La neuroinflamación es uno de los mecanismos neurobiológicos implicados en el desarrollo de trastornos del estado de ánimo en modelos animales (Welcome, 2020), por lo que la desregulación en el metabolismo de las ceramidas podría contribuir a la generación de neuroinflamación cerebral y al desarrollo de los trastornos de ansiedad. A continuación, abordaremos el papel de la neuroinflamación en el desarrollo de ansiedad y su asociación con los niveles de ceramidas.

2.6 Activación inmunológica y neuroinflamación en la fisiopatología de trastornos psiquiátricos

La neuroinflamación ha emergido como un factor central en la fisiopatología de múltiples trastornos psiquiátricos. Durante las últimas dos décadas, se ha incrementado el interés por comprender el papel de la activación inmunológica en los trastornos psiquiátricos, lo cual ha impulsado una nueva era en el estudio e intervención psiquiátrica. Se han identificado alteraciones inmunológicas en trastornos como depresión mayor, trastornos de ansiedad, trastorno bipolar,

esquizofrenia y el trastorno obsesivo-compulsivo. Tanto los estudios clínicos como los experimentales sugieren que procesos inflamatorios en el cerebro podrían explicar parte de estas alteraciones y contribuir a la sintomatología psiquiátrica (Hole et al., 2025). Se ha documentado que la modulación inmune periférica puede inducir alteraciones conductuales y síntomas psiquiátricos en modelos animales y en humanos. Por ejemplo, en roedores sanos, la administración de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α promueve una conducta similar a la depresión caracterizada por apatía y retraimiento social (Hennessy et al., 2017). En estudios clínicos, la aplicación de dosis bajas de endotoxina en sujetos sanos produce una desactivación del cuerpo estriado ventral, región implicada en el procesamiento de la recompensa, lo que se asocia con la aparición de anhedonia. De manera semejante, cerca del 45% de los pacientes tratados con interferón alfa (IFN- α) desarrollan síntomas depresivos, los cuales se correlacionan con incrementos en las concentraciones séricas de IL-6 (Hepgul et al., 2018). Diversas condiciones médicas caracterizadas por inflamación crónica como diabetes, artritis reumatoide y esclerosis múltiple se han identificado como factores de riesgo para el desarrollo de depresión y ansiedad, lo cual sugiere la existencia de un proceso inflamatorio sistémico que impacta al cerebro (Bickett & Tapp, 2016; Hanna & Strober, 2020).

En este contexto, la microglía, considerada el principal tipo celular inmunitario del SNC, ha emergido como un elemento clave en la investigación actual, representando aproximadamente el 10 % de las células cerebrales y distribuyéndose tanto en sustancia gris como blanca, así como en la médula espinal (Ajami et al., 2007). Su origen se remonta a células progenitoras mesodérmico-mesenquimales del saco vitelino, que migran tempranamente al SNC y permanecen como la población de macrófagos residentes (Prinz et al., 2021). En condiciones fisiológicas, estas células exhiben un fenotipo ramificado, con soma reducido y prolongaciones extensas, y expresan marcadores como P2RY12, característicos del estado vigilante, mientras mantienen

niveles bajos de proteínas asociadas a fagocitosis como CD68. Al percibir señales de daño o inflamación, la microglía entra en un estado activado con transformaciones morfológicas, funcionales y transcripcionales, adoptando una forma ameboide y aumentando la expresión de marcadores como CD86, MHC II, iNOS o CD40, asociados al fenotipo proinflamatorio (M1). Simultáneamente, se genera producción de quimiocinas, citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (Biswas, 2023; Salter & Stevens, 2017). Además, en algunos escenarios, la microglía puede adquirir estados activados con características antiinflamatorias tipo M2, que expresan marcadores como CD206, Arginasa-1 (Arg1), FIZZ1, y secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β), contribuyendo a la resolución, remodelación tisular y reparación (Boche et al., 2013; Varin & Gordon, 2009). Cabe destacar que la polarización microglial no es dicotómica, sino que existe un continuo dinámico, donde fenómenos transicionales coexpresan marcadores tanto M1 como M2 simultáneamente (Masuda et al., 2020).

Los hallazgos tanto clínicos como experimentales refuerzan la hipótesis de que la neuroinflamación constituye un mecanismo central en la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos. En particular, se ha descrito activación microglial y respuestas inmunológicas alteradas en circuitos cerebrales relacionados con la regulación emocional, incluyendo la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (PFC), regiones cuya disfunción se asocia de manera consistente con la ansiedad y la depresión. Estudios de neuroimagen y análisis de biomarcadores han mostrado que esta activación inflamatoria cerebral se correlaciona con síntomas afectivos y ansiosos, lo que subraya la relevancia clínica de estos procesos neuroinmunológicos (Lu et al., 2022; J. Wang et al., 2023). En este marco, los lípidos bioactivos, y en particular las ceramidas, han cobrado interés como moduladores de la respuesta neuroinflamatoria. Su participación en la regulación de la microglía sugiere que podrían constituir un punto de convergencia entre la alteración del metabolismo lipídico y la desregulación inmunológica cerebral observada en los

trastornos de ansiedad.

2.7 Ceramidas como potenciales moduladores de la neuroinflamación

Los lípidos constituyen aproximadamente el 50% del peso seco del cerebro, convirtiéndolo en el órgano con el segundo mayor contenido de lípidos después del tejido adiposo (Futerman, 2016). Se sabe que las alteraciones en los componentes lipídicos de la membrana neural pueden influir en procesos apoptóticos, respuesta a estrés, metabolismo y regulación de la inflamación (Honn & Zeldin, 2019). En el cerebro la microglía es la célula inmunitaria especializada que orquesta la respuesta inmunológica mediante la liberación de mediadores proinflamatorios (Salter & Stevens, 2017). En este contexto, se ha reportado que las ceramidas de cadena larga como C16:0, C18:0, C20:0, C24:0 y C24:1 inducen la activación de NF- κ B (Lee et al., 2020; Mondal et al., 2021), aumentan la expresión de Iba-1 (Nakamura et al., 2021; Torres-Odio et al., 2017). Contrariamente, las ceramidas de cadena corta como C2:0, C6:0 y C8:0 aumentan la expresión de BDNF en microglía, lo cual se asocia con la polarización M2 y reducen la expresión de TNF- α , IL-6 y la producción de iNOS (Jung et al., 2013; Li et al., 2024). La ceramida C20:0 induce la expresión de TGF β e IL-10, indicativos de un perfil antiinflamatorio en microglía (Chmielarz et al., 2024).

Diversos estudios han documentado que la eliminación del gen que codifica la ceramida sintasa 6 (CerS6) en ratones reduce los niveles de ceramida C16:0 en el cerebelo y el prosencéfalo, lo cual se asocia con un aumento en el número de células de microglía (Ebel et al., 2013). Por otro lado, la administración directa de ceramida C20:0 en el hipocampo ventral desencadena una respuesta microglial (Fonseca-Ferrer et al., 2022). Asimismo, la deficiencia de enzimas catabólicas clave de las ceramidas, como la ceramidasa ácida o la reducción de la actividad de la

esfingomielinasa neutra, conduce a una acumulación de ceramida, hidroxiceramida, dihidroceramida y GM3 en el cerebro. Este desequilibrio lipídico se asocia con la activación de microglía e infiltración de macrófagos en el SNC, (Kalinichenko et al., 2022; Sikora et al., 2017).

Además, otras especies de ceramidas, como la galactosilceramida, también se han vinculado con procesos inflamatorios en el sistema nervioso central (O'Sullivan & Dev, 2015). En contraste, la sobreexpresión del receptor 3 de esfingosina-1-fosfato (S1P3) en la corteza prefrontal medial (mPFC) tiene un efecto protector al inhibir la expresión de TNF- α (Corbett et al., 2019).

De acuerdo con estos hallazgos, la ceramida desempeña un papel significativo en la inflamación microglial y su función podría depender de la longitud de las cadenas acilo.

2.8 Ceramidas y homeostasis mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos celulares delimitados por una doble membrana que se encuentran en abundancia en el citosol de las células eucariotas. Se encargan de generar la energía del organismo en forma de ATP, producida principalmente mediante fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna. Además, desempeñan múltiples funciones en el metabolismo celular, tales como la biosíntesis de macromoléculas, el catabolismo de nutrientes y la homeostasis redox, entre otros procesos (Filiou & Sandi, 2019a). También facilitan la adaptación celular a diversos estímulos, como el estrés, gracias a su capacidad para establecer dinámicas de fusión y fisión, migrar a diferentes localizaciones dentro de la célula e interactuar con otros orgánulos, como el retículo endoplásmico (Picard & McEwen, 2018).

Recientemente se ha propuesto una etiología mitocondrial para los trastornos neuropsiquiátricos, considerando el papel esencial de las mitocondrias en el sistema nervioso. El cerebro presenta un elevado consumo energético, utiliza aproximadamente el 20 % del oxígeno y

el 25 % de la glucosa del organismo. Por lo que las alteraciones en la función mitocondrial podrían tener un impacto significativo en las funciones cerebrales, incrementando la vulnerabilidad a trastornos del sistema nervioso central. Además, las mitocondrias participan en la producción y el metabolismo de glucocorticoides, desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de catecolaminas, además de ser moduladas funcionalmente por estas hormonas y otros mediadores de la respuesta al estrés (Filiou & Sandi, 2019a). Por consiguiente, la función mitocondrial está asociada con los mecanismos de adaptación y regulación al estrés.

De interés para este proyecto, en modelos murinos que exhiben una conducta similar a la ansiedad se han reportado niveles elevados de ácido láctico y disfunción mitocondrial (L. Liu et al., 2018), disminución de ácido succínico en la corteza prefrontal (Y. Y. Liu et al., 2017), reducción en los niveles de respiración mitocondrial en núcleo accumbens (Hollis et al., 2015) y un aumento en la producción de ROS, asociado con la activación de la microglía (Lehmann et al., 2019). In vitro, la acumulación intracelular de ceramidas C18:0 y C24:0 reduce la capacidad respiratoria, incrementa la autofagia y provoca disfunción mitocondrial en contextos de lipotoxicidad (Bekhite et al., 2021; Kretzschmar et al., 2021). También, la combinación de ceramida C6:0 y tamoxifeno disminuye el potencial de membrana mitocondrial y la respiración en el complejo I, desencadenando la liberación de ROS y proteínas proapoptóticas en células de leucemia mieloide aguda (Morad et al., 2016). Los análogos de ceramidas C2:0 y C6:0 inducen la liberación de citocromo c en mitocondrias aisladas, lo que produce una reducción en el consumo de oxígeno mitocondrial y el potencial de membrana ($\Delta\Psi$), causando disfunción mitocondrial y producción de ROS (Ghafourifar et al., 1999).

Además de estas alteraciones funcionales, estudios recientes han demostrado que la dinámica mitocondrial, en particular los procesos de fusión y fisión permite la coexistencia de rutas metabólicas potencialmente incompatibles dentro de la célula. Por ejemplo, cuando aumenta la

dependencia celular de la fosforilación oxidativa, la enzima pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS), encargada de la síntesis reductiva de prolina y ornitina, se segrega en un subgrupo de mitocondrias carentes de crestas mitocondriales y de ATP sintasa. Esta compartimentalización metabólica depende tanto de la capacidad intrínseca de P5CS para formar filamentos como de los ciclos de fusión y fisión mitocondrial. La interrupción de estas dinámicas impide la separación funcional entre las mitocondrias especializadas en síntesis reductiva y aquellas encargadas de la producción de ATP, lo que obliga a las células a priorizar una vía metabólica sobre otra dependiendo del contexto (Ryu et al., 2024). Este hallazgo evidencia que la segmentación funcional de las mitocondrias es un mecanismo esencial para mantener el equilibrio entre las demandas bioenergéticas y biosintéticas celulares, y su alteración podría contribuir a la disfunción mitocondrial.

Diversos estudios han demostrado que la integridad y función mitocondrial están profundamente interconectadas con la inmunidad innata (Filiou & Sandi, 2019b). Las mitocondrias, como orgánulos intracelulares, son cruciales para múltiples funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético, la regulación de la señalización mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS), la homeostasis del Ca^{2+} y la apoptosis (Culmsee et al., 2019). Además, ciertos componentes mitocondriales, como el trifosfato de adenosina (ATP), los péptidos N-formilados y el ADN mitocondrial (mtDNA), actúan como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Estos son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), lo que desencadena una respuesta inflamatoria (Garcia-Segura et al., 2024). Por lo que las ceramidas podrían coordinar la respuesta inflamatoria observada en los trastornos de ansiedad.

3. JUSTIFICACIÓN

Los factores neurobiológicos implicados en el desarrollo de los trastornos de ansiedad no se conocen completamente. La desregulación en el metabolismo de esfingolípidos ha sido sugerida como uno de los mecanismos que contribuye a la sintomatología de estos trastornos, en específico se ha reportado una mayor concentración de ceramidas en el plasma de pacientes con trastornos de ansiedad. Aunque se desconoce cómo las ceramidas contribuyen a la sintomatología, se propone que las ceramidas podrían inducir disfunción mitocondrial y favorecer la activación de vías inflamatorias, contribuyendo a la consolidación del fenotipo de ansiedad.

En este proyecto se propone caracterizar el efecto de las ceramidas de cadena larga en la inducción de la conducta similar a la ansiedad en un modelo murino, mediante disfunción mitocondrial y activación en la microglía.

4. HIPÓTESIS

Las ceramidas de cadena larga inducen conducta similar a la ansiedad a través de la disfunción mitocondrial y activación en la microglía.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar la contribución de las ceramidas en la inducción de conducta similar a la ansiedad a través de la disfunción mitocondrial y la activación de la microglía.

5.2. Objetivos específicos

1. Identificar el efecto de las ceramidas C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1 en el desarrollo de conducta similar a la ansiedad en ratones.
2. Determinar la activación de la microglía inducida por las ceramidas de cadena larga en ratones con conducta similar a la ansiedad.
3. Evaluar el efecto de las ceramidas en la actividad fagocítica de la microglía y la expresión de genes inflamatorios *in vitro*.
4. Caracterizar el efecto de las ceramidas en la función mitocondrial de células microgliales *in vitro*.
5. Cuantificar citocinas y ceramidas C16:0, C18:0, C22:0, C24:0, C24:1 en suero de sujetos con trastorno de ansiedad.

6. METODOLOGÍA

6.1. Estrategia experimental

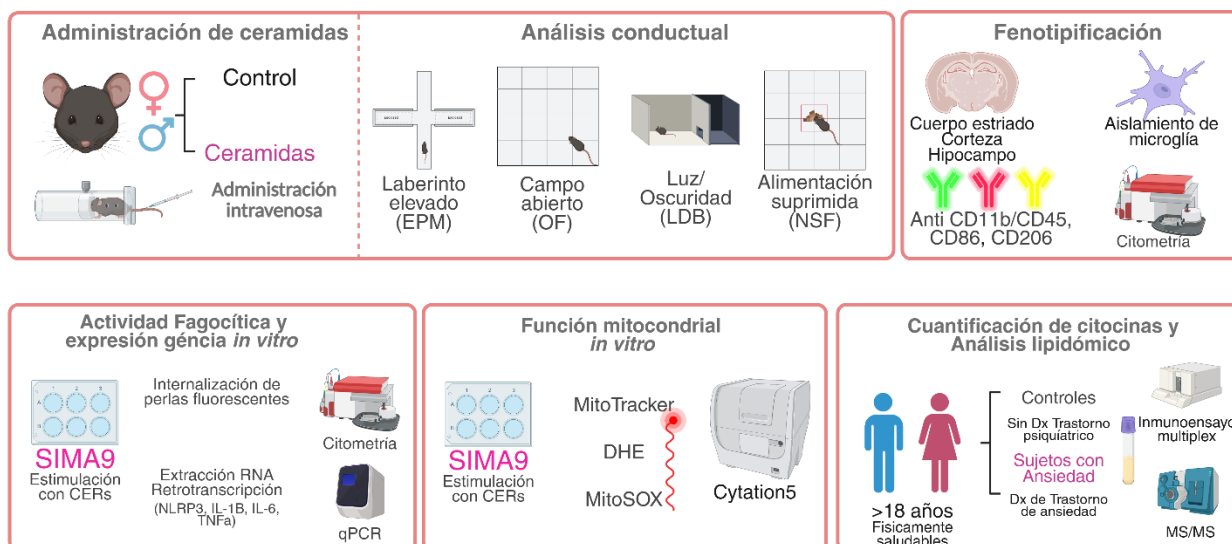


Figura 3. Esquematización de la estrategia experimental. Para la estrategia experimental los ratones fueron administrados con ceramidas de cadena larga por vía intravenosa, se sometieron a 4 pruebas conductuales para determinar si presentaban un fenotipo similar a la ansiedad. Posteriormente se realizó el aislamiento de células microgliales del cerebro para caracterizar el fenotipo de activación. Para entender con mayor detalle los mecanismos celulares implicados, *in vitro*, la línea celular de microglía fue estimulada con las ceramidas y se analizó la actividad fagocítica, la expresión de genes proinflamatorios, el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS. Para trasladar estos hallazgos al contexto clínico se analizaron muestras de sujetos con trastorno de ansiedad para explorar si las alteraciones inflamatorias y lipídicas estaban presentes a nivel periférico.

Los ratones, machos y hembras fueron inyectados por vía intravenosa empleando como vehículo solución salina adicionada con BSA al cual se le añadieron las ceramidas C16:0, C18:0, C22:0 C24:0 y C24:1, como control, un segundo grupo fue administrado con el vehículo. 24 horas después, los animales se sometieron a 4 pruebas conductuales para identificar si presentan un fenotipo similar a la ansiedad. Posteriormente los ratones fueron sacrificados y se disectaron la corteza, cuerpo estriado e hipocampo para aislar las células microgliales, las cuales fueron fenotipificadas por citometría de flujo. Para el enfoque *in vitro*, la línea celular de microglía fue estimulada con las ceramidas antes mencionadas y se determinó su actividad fagocítica por

citometría de flujo, la expresión de genes proinflamatorios mediante qPCR y el potencial de membrana mitocondrial, así como la presencia de ROS a través de sondas fluorescentes. En humanos se trabajó con muestras de plasma de sujetos con ansiedad para cuantificar por un inmunoensayo multiplex los niveles de citocinas y mediante espectrometría de masas los niveles de ceramidas.

6.2 Animales de laboratorio

Todos los experimentos se realizaron empleando 48 ratones hembra y 38 machos de la cepa C57/BL6J de entre 12-14 semanas de edad y un peso de 20–23 g y 27–30 g respectivamente. Estos fueron alojados individualmente en jaulas de plexiglás, mantenidas a 20–23 ° C en una habitación con temperatura controlada con un ciclo luz / oscuridad de 12 h. El agua y comida (Labdiet5000) estuvo disponible *ad libitum* en la jaula. Los ratones fueron separados por sexo y divididos equitativamente en el grupo control y ceramidas (hembras n = 24, machos n = 19 por grupo).

6.3 Administración de ceramidas

Las ceramidas C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1 (Avanti Polar Lipids Inc). se disolvieron en dimetilsulfóxido (Sigma, D2650) y se diluyeron en una solución de cloruro de sodio al 0.9% con 1% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (Equitech-Bio, BAH66) como vehículo, a una concentración final de 0.47, 0.6, 0.5, 3.5 y 0.9 nM, respectivamente en un volumen final de 100 µL (Schumacher, Edwards, et al., 2022). Las concentraciones de ceramidas se seleccionaron con base en un análisis lipídico previo realizado por nuestro grupo, el cual identificó el perfil de ceramidas plasmáticas en la descendencia de madres alimentadas con una dieta alta en

grasas (Camacho-Morales et al., 2024). El cóctel de ceramidas se inyectó por vía intravenosa en la vena lateral caudal de la cola. El grupo control recibió la solución vehículo.

6.4 Pruebas conductuales

Para identificar si el modelo murino presenta un comportamiento similar a la ansiedad, los ratones se sometieron a distintas pruebas conductuales descritas a continuación.

Las pruebas se realizaron con un día de separación entre cada una de ellas como tiempo de recuperación para minimizar los efectos de estrés acumulado. Antes de cada evaluación, todos los ratones fueron aclimatados a la sala de pruebas durante una hora, y el mismo experimentador realizó los procedimientos para minimizar el estrés. Todas las pruebas se llevaron a cabo bajo condiciones controladas de iluminación de 300 lux, y entre los sujetos, los aparatos se limpiaron con etanol al 70% para evitar el sesgo por pistas olfativas. La actividad de los ratones fue grabada en video utilizando un sistema automático de sensores de movimiento (OMNIALVA, Inc).

6.4.1 Laberinto elevado

La prueba se basa en la aversión natural de los ratones por las áreas abiertas y elevadas, así como en su comportamiento exploratorio natural espontáneo en entornos novedosos. El laberinto consta de cuatro brazos que miden 30×5 cm cada uno y una plataforma central de 5×5 cm, fabricado con material acrílico negro opaco y un borde blanco en el suelo. Dos de los brazos son abiertos, mientras que los otros dos están rodeados por paredes de 15 cm de altura. El laberinto estaba elevado a una altura de 50 cm sobre el suelo. Los sujetos fueron colocados en el centro del laberinto mirando hacia un brazo cerrado y se les permitió explorar libremente el laberinto durante

5 minutos. Se cuantificó el número de entradas a los brazos cerrados y abiertos, así como el tiempo pasado en cada tipo de brazo. (Walf & Frye, 2007).

6.4.2 Campo abierto

Esta prueba evalúa la respuesta innata del roedor a los espacios abiertos además de su impulso exploratorio y se basa en la tendencia de los roedores a evitar las áreas expuestas. Los animales fueron colocados en la esquina de una arena de campo abierto de plexiglás transparente de 50x50 cm y se les permitió explorar libremente durante 10 min. Posteriormente se determinó la distancia total recorrida, porcentaje de inactividad y el tiempo que pasa en las orillas de la arena empleando el software ToxTrack.

6.4.3 Prueba de caja de luz y oscuridad

Esta prueba evalúa la reacción del animal al contexto aversivo y propenso a la ansiedad de estar en un área brillantemente iluminada. Para la prueba se utilizó una caja de acrílico blanco de 50×50 cm. La caja estaba dividida por una partición de acrílico, con un tercio del área total cubierto por la parte superior y los dos tercios restantes abiertos e iluminados. Una pequeña puerta (5×7 cm) permitía a los ratones moverse entre los compartimentos. Los ratones fueron colocados en el compartimento oscuro y se les permitió explorar libremente durante 5 minutos. Se midió el tiempo de latencia para entrar al compartimento iluminado y el tiempo pasado en cada uno de los compartimentos. (Ennaceur & Chazot, 2016).

6.4.4 Prueba de alimentación novedosa suprimida

Esta prueba evalúa la latencia para consumir comida en un entorno novedoso, que suele ser un campo abierto. El entorno novedoso induce ansiedad, lo que resulta en un retraso en la ingesta de alimentos. Los ratones fueron sometidos a un período de ayuno de 18 h. Posteriormente, cada ratón fue colocado en una esquina del campo abierto. En el centro de la arena, se colocó un pellet de comida. Se registró el tiempo que tardó el ratón en comenzar a comer después del período de ayuno. Los ratones que alcanzaron con éxito el pellet fueron regresados a su jaula y se les proporciona comida previamente pesada. Se cuantificó la latencia para comer en la jaula y la cantidad de comida ingerida después de 20 minutos. (Ramaker & Dulawa, 2017).

6.4.5 Cálculo del Z-score de emocionalidad

Los Z-scores son herramientas matemáticas adimensionales que permiten la normalización de los resultados dentro de los estudios y la posterior comparación de datos relacionados entre diferentes estudios. Los Z-scores son puntuaciones estandarizadas que indican cuántas desviaciones estándar se encuentra una observación por encima o por debajo de la media de un grupo control. En el presente trabajo, dado que investigamos los efectos de la administración de ceramidas, contemplando también la diferencia entre sexo el grupo de machos control se utilizó para la normalización empleando la siguiente fórmula:

$$z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

Donde X representa el valor individual para cada parámetro observado. μ y σ representan

el promedio y la desviación estándar para el grupo control.

Los valores del Z-score se calcularon para los parámetros de prueba que miden la emocionalidad. La direccionalidad de las puntuaciones se ajustó de manera que los valores de puntuación aumentados reflejaran una mayor dimensionalidad (emocionalidad). Se utilizaron medidas estándar de comportamientos similares a la ansiedad de acuerdo con lo reportado por Guilloux y colaboradores (2011). Para la prueba EPM se empleó la proporción de tiempo pasado en cada brazo y la proporción de entradas en los brazos abiertos. En la prueba OF se utilizó el porcentaje de tiempo en las orillas, porcentaje de exploración y tiempo de inmovilidad. Para la prueba LDB se seleccionó la latencia para entrar en el compartimento iluminado, así como el tiempo pasado en el compartimento iluminado. En la prueba NSF, se utilizó la latencia para alimentarse en el campo abierto. Los puntajes individuales de emocionalidad se calcularon promediando los valores de Z-score a través de las pruebas. Un Z-score de emocionalidad se calculó para cada animal basado en 4 pruebas diferentes:

$$Emocionalidad = \frac{zEPM + zOF + zLDB + zNSF}{\text{Número de pruebas}}$$

6.5 Aislamiento de células microgliales

6.5.1 Sacrificio y disección

Para analizar el fenotipo de la microglía, las células fueron aisladas del hipocampo, corteza y cuerpo estriado del cerebro de los ratones. Los ratones se sacrificaron empleando sobredosis de pentobarbital sódico, se retiró la cabeza del ratón y la parte superior del cráneo, se realizó un corte en el centro del cráneo por debajo del gancho post-timpánico izquierdo; y un último corte entre los

ojos. Se removió el hueso frontal y parietal y finalmente se obtuvo el cerebro. Posteriormente se removió el bulbo olfatorio y se obtuvo el cuerpo estriado, la corteza e hipocampo. El tejido se homogenizó de forma mecánica con un bisturí en HBSS 1x (Sigma, Cat. H6136), se transfirió a un tubo cónico de 15 mL posteriormente se centrifugó a $1000 \times g$ durante 10 minutos.

6.5.2 Disociación enzimática

Después de la centrifugación se procedió a decantar el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 mL de HBSS 1x con collagenasa D (Roche, 11088866001) y dispasa II (Sigma, D4693) a una concentración de 2 mg/mL, este se incubó durante 20 minutos a 37 °C en agitación. Después de la incubación enzimática se disgregó el tejido con una pipeta de 1 mL y se añadió suero fetal bovino (Sigma, 16000044) al 10 % (v/v), la muestra se centrifugó a $1000 \times g$ durante 10 min y se descartó el sobrenadante.

6.5.3 Gradientes de Percoll™ para aislamiento de microglía

Para el aislamiento de microglía se empleó un gradiente de Percoll™ isotónico al 30% y 70%. La solución isotónica se preparó mezclando Percoll™ (Sigma, Cat. P1644) con buffer HBSS 10x en una proporción 1:10 (HBSS:Percoll). A partir de esta mezcla, se obtuvieron las soluciones al 70% y 30% diluyendo con buffer HBSS 1x.

6.5.4 Obtención de células microgliales por gradiente de densidad

El pellet celular se resuspendió en 6 mL de Percoll 70%, y se agregaron 6 mL de Percoll al

30% para formar la capa superior, evitando mezclar las fases y finalmente se añadió 1 mL de HBSS 1x a la fase superior. El gradiente se centrifugó a $1200 \times g$ por 45 minutos sin freno ni aceleración. Se colectaron 2 mL de la interfase 70 - 30% y se colocaron en un tubo de 15 mL, se aforó a 15 mL con medio HBSS 1x y se centrifugó la suspensión celular a $1000 \times g$ durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ L de PBS 1x.

6.5.5 Fenotipificación de la microglía

La microglía aislada se incubó con anticuerpos primarios 1:100 diluidos en PBS 1x. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD11b (Miltenyi Biotec, 130-113-805), anti-CD45 (BD Pharmingen, 553076), anti-CD86 (BD Pharmingen, 561964) y anti-CD206 (BioLegend, 141703). Para cada anticuerpo, las células se incubaron durante 30 min y posteriormente fueron lavadas y resuspendidas en 100 μ L de PBS 1x para su análisis en el citómetro de flujo BD Accuri 6. Se determinó el porcentaje de células positivas para cada marcaje.

6.6 Análisis *in vitro*

6.6.1 Mantenimiento de la línea celular SIM-A9

Para los ensayos *in vitro* se empleó la línea celular SIM-A9 (ATCC, CRL-3265) de microglía murina. Las células se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5%, en cajas de cultivo de 25 cm³ con medio DMEM: F-12 (Sigma, 11320033) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 1% (v/v) de estreptomicina y penicilina (Sigma, 15070063).

6.6.2 Cultivo de microglía en placa

Las células SIM-A9 se incubaron en las condiciones previamente descritas y cuando alcanzaron una confluencia de 90% fueron colectadas y sembradas en placa de 6 pocillos a una densidad de 100,000 células por pozo en medio DMEM-F12 sin suero fetal bovino para el ensayo de fagocitosis y en placas de 96 pocillos a una densidad de 5000 células por pozo para el análisis de potencial de membrana y detección de ROS. Las células se incubaron durante 24 horas y posteriormente fueron estimuladas con un cóctel de ceramidas a 1 μ M (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1) o 500 ng de lipopolisacárido (LPS) (Sigma, L2630) como control positivo de inflamación.

6.6.3 Ensayo de fagocitosis

La fagocitosis en microglía se determinó utilizando perlas de látex fluorescentes verdes (Sigma, L1030), que fueron pre-opsonizadas en suero fetal bovino en una proporción 1:5 durante 1 h a 37°C en agitación. Las células de microglía fueron incubadas con las perlas a una concentración final de 0.1% (v/v) durante 6 h a 37°C. Como control negativo de fagocitosis las células con las perlas de látex se incubaron a 4°C (Cruz-Carrillo et al., 2020). Posterior a la incubación el medio celular que contenía las perlas fue descartado y las células fueron lavadas tres veces con PBS 1x. Las células fueron despegadas utilizando 1 mL de la solución PBS/EDTA/EGTA/Glucosa y resuspendidas en 100 μ L de PBS 1x para su análisis en el citómetro de flujo BD Acuri C6 Plus. Se determinó el porcentaje de células positivas para FITC, que representan aquellas células que internalizaron las perlas.

6.6.4 Análisis de Expresión de genes proinflamatorios

Luego de la exposición a ceramidas o LPS se realizó la extracción de ARN mediante el método de TRIzol, se añadieron 1 mL de reactivo frío a cada pozo, y la muestra fue homogeneizada mediante pipeteo. Posteriormente, el contenido se transfirió a un tubo de 1.5 mL e incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para facilitar la disociación completa de las nucleoproteínas.

A continuación, se incorporaron 200 μ L de cloroformo frío, se mezcló vigorosamente durante 30 segundos mediante vortex y se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . La fase acuosa resultante se recuperó y transfirió a un nuevo tubo, donde se añadió 0.5 mL de isopropanol frío para precipitar el ARN. Las muestras se incubaron a -20°C durante toda la noche y se centrifugaron a $7500 \times g$ por 10 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 0.5 mL de etanol al 75%. Este paso se repitió dos veces, con centrifugación a $12,000 \times g$ por 10 minutos entre cada lavado. Finalmente, el ARN precipitado se resuspendió en 30 μ L de agua libre de RNasas. Se realizó la retrotranscripción del RNA empleando el kit High-Capacity cDNA reverse transcription kit with RNase Inhibitor. Cada muestra de ARN fue cuantificada utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 8000 y fueron ajustadas a una concentración de 200 ng de ARN total en un volumen final de 10 μ L. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador, con un programa que consistió en 10 minutos a 25°C , seguido de 120 minutos a 37°C y una etapa final de 5 minutos a 85°C . Para la cuantificación relativa de la expresión génica se utilizaron 5 μ L de SYBR® Green SuperMix, 2 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de cada cebador, a una concentración final de 0.5 μM . A esta mezcla, con un volumen total de 9 μ L, se le añadió 1 μ L de ADNc, alcanzando un volumen final de 10 μ L por reacción. La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems 7500 Fast utilizando el siguiente programa térmico: 50°C durante 2 minutos, seguido de 95°C durante 10 minutos; posteriormente, se llevaron a cabo 40

ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos. Se evaluó la expresión de los genes proinflamatorios IL- β (Forward, 5'-GCAACTGTTCTGAACTCAAC-3'. Reverse, 5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'), IL-6 (Forward, 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTC-3'. Reverse, 5'-TTGGTCAGCCACTCCTTC-3'), TNF α (Forward, 5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'. Reverse, 5'-CGATCACCCCGAAGTCAGTAG-3'.) y NLRP3 (Forward, 5'- ATT ACCCGCCCGAGA AAGG-3'. Reverse, 5'- TCGCAGCAAAGATCC ACACAG-3'), la expresión relativa fue normalizada utilizando el gen constitutivo 36B4 (Forward, 5'-TCCAGGCTTTGGGCATCA-3'. Reverse, 5'-CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA-3') como control endógeno. El análisis de los resultados se realizó mediante el método comparativo de cuantificación $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.6.5 Determinación del potencial de membrana mitocondrial en microglía

Posterior a la incubación con ceramidas, el potencial de la membrana mitocondrial se determinó utilizando la sonda permeable MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, M7512). Las células sembradas en placa de 96 pocillos se lavaron con PBS 1x y se añadieron 25 nM de MitoTracker diluido en medio de grabación (RM) compuesto de 156 mM NaCl; 3 mM KCl; 2 mM MgSO₄; 1.25 mM KH₂PO₄; 10mM D-Glucosa; 2 mM CaCl₂; 10 mM Hepes; con pH 7.3–7.4 durante 30 min a 37°C. La señal de fluorescencia se midió utilizando el lector multimodal de imágenes celulares Cytation 5 (Agilent BioTek) a una longitud de onda de excitación y emisión de 579 y 599 nm, respectivamente para determinar la intensidad de la fluorescencia.

6.6.6 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno citosólicas y mitocondriales en la microglía

Después del tratamiento con las ceramidas las células fueron lavadas con PBS 1x se agregó 5 μ M de dihidroetidio (DHE) (Invitrogen, D1168) para el análisis de superóxido citosólico o 5 μ M de MitoSOX como indicador de superóxido mitocondrial (Invitrogen, M36009) en el medio de grabación (RM) compuesto por; 156 mM NaCl; 3 mM KCl; 2 mM MgSO₄; 1.25 mM KH₂PO₄; 10mM D-Glucosa; 2 mM CaCl₂; 10 mM Hepes; pH 7.3–7.4, a 37°C. Los datos de fluorescencia de DHE y MitoSOX fueron recolectados en intervalos de 2 min durante 30 min. La señal de fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación y emisión de 480-520 y 570-600 nm, respectivamente utilizando el lector multimodal de imágenes celulares Cytation 5 (Agilent BioTek).

6.7 Análisis lipídomico y perfil inflamatorio en plasma de sujetos con ansiedad

6.7.1 Recolección de muestras y evaluación clínica

Se trabajó con muestras de plasma obtenidas de sujetos diagnosticados con trastorno de ansiedad, así como de un grupo control sin sintomatología ansiosa. A todos los participantes se les proporcionó información detallada, tanto de manera oral como escrita, sobre los objetivos y procedimientos del estudio. Aquellos que aceptaron participar firmaron voluntariamente el consentimiento informado, tras lo cual se procedió a la toma de muestra de sangre periférica. Además, se recopilaron datos demográficos, antecedentes médicos y antecedentes psiquiátricos familiares mediante una hoja de recolección de datos diseñada para este fin. Para la evaluación clínica, tanto los pacientes como los controles fueron sometidos a tres instrumentos validados para la medición de sintomatología ansiosa: la Escala de Impresión Clínica Global (CGI-S), la Escala

de Ansiedad Generalizada de 7 ítems (GAD-7) y el Inventario de Ansiedad de Beck (BAI). Los puntajes de estas escalas se integraron posteriormente en un score compuesto de ansiedad.

6.7.2 Criterios de inclusión y exclusión

Para el grupo control, los criterios de inclusión fueron: ser mayor de 18 años, encontrarse en buen estado de salud física y no presentar diagnóstico psiquiátrico ni sintomatología ansiosa. Se excluyeron aquellos participantes que no cumplieran con los criterios de salud, presentaban síntomas de ansiedad o no eran capaces de otorgar su consentimiento informado. En el grupo clínico, se incluyeron sujetos mayores de 18 años, con buena salud física, valorados por un psiquiatra certificado que confirmara el diagnóstico de trastorno de ansiedad, y que no hubieran recibido tratamiento farmacológico previo. Se excluyeron aquellos participantes cuyo estado de salud no fuera adecuado, que no cumplieran con los criterios diagnósticos para trastorno de ansiedad según la valoración clínica o que no pudieran firmar el consentimiento informado.

6.7.3 Cuantificación de citocinas

A partir de la sangre colectada en tubos con EDTA se aisló el plasma centrifugando las muestras a $1000 \times g$ durante 10 min. Se utilizaron 25 μl para realizar el análisis de citocinas por inmunoensayo multiplex. El análisis se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante para el kit MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay que evalúa los niveles de IL-10, IL-17A, IL-1 β , IL-6, IL-7, MCP1 y TNF α . La lectura de los datos se realizó en el equipo Luminex® 200™ Multiplexing Instrument.

6.7.4 Cuantificación de ceramidas

La cuantificación de ceramidas en muestras de plasma humano se realizó mediante espectrometría de masas. Para la extracción de lípidos, se utilizó el método clásico de Bligh & Dyer con modificaciones para optimizar la recuperación de ceramidas. Se emplearon 50 μL de plasma por muestra, a los cuales se añadieron 975 μL de agua, 2 mL de metanol y 900 μL de diclorometano (DCM). Se incorporó una mezcla de estándares internos (Usplash®, Avanti Polar Lipids Inc.) para control de recuperación y cuantificación absoluta. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añadió una segunda fase de extracción con 1 mL de agua y 900 μL de (DCM). Posteriormente, las fases se separaron por centrifugación a $1400 \times g$ durante 10 minutos y se recuperó la fase orgánica inferior. Las fases orgánicas combinadas se secaron utilizando un concentrador LabConco Centrивap a 30 °C durante 90 minutos. Después del secado, las muestras se reconstituyeron en 350 μL de una solución de acetato de amonio 10 mM en una mezcla de DCM:MeOH (50:50, v/v). La detección y cuantificación se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro de masas Sciex QTRAP 6500plus acoplado a un sistema de separación por movilidad diferencial (DMS) (SelexION™), operado en modo de ionización por electrospray. Se inyectaron 90 μL de cada muestra mediante inyección directa a un flujo de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ utilizando un sistema LC-Exion AD 30. Se empleó una lista de adquisición dirigida (MRM) con DMS activado. La adquisición y procesamiento de datos se realizaron con el software Shotgun Lipidomics Assistant (SLA) versión 1.5, una herramienta basada en Python que permite la selección de transiciones MRM de lípidos y estándares, además de correcciones isotópicas. Las intensidades de cada especie lipídica se compararon con las de sus estándares internos, cuyas cantidades conocidas se emplearon como referencia para la cuantificación. A partir de esta relación se calcularon las concentraciones absolutas en nmol, aplicando la corrección por el volumen de muestra analizado (Su et al., 2021).

6.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos, que incluyeron pruebas de normalidad, ANOVA de una vía, Kruskal-Wallis, prueba t de Student y U de Mann-Whitney, se empleó el software GraphPad Prism 10.2.0. La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

Se construyeron modelos de regresión múltiple utilizando los datos conductuales y la fenotipificación de microglía para predecir la asociación entre el Z-score de las pruebas conductuales como variable dependiente y el fenotipo M1/M2 microglial como variable independiente en el modelo murino. De forma análoga, se realizaron análisis de regresión lineal simple en muestras humanas para evaluar la relación entre el score de ansiedad y los niveles plasmáticos de los lípidos analizados, presentados también como coeficientes beta (β) con intervalos de confianza al 95% (IC 95%).

Los datos fueron estandarizados antes del análisis, y los valores atípicos potenciales se gestionaron utilizando métodos estadísticos robustos. Estos análisis se llevaron a cabo en RStudio versión 4.3.0 con las siguientes fórmulas base: $\text{lm}(\text{Zscore} \sim \text{M1 cortex} * \text{M2 hippocampus})$ para el modelo murino y $\text{lm}(\text{Anxiety score} \sim \text{Ceramide})$ para el análisis en humano

7. RESULTADOS

7.1 Los ratones hembra administradas con ceramidas presentan una conducta similar a la ansiedad

Para evaluar el efecto de las ceramidas de cadena larga y muy larga en la conducta los ratones fueron sometidos a un set de cuatro pruebas conductuales. Primero evaluamos el comportamiento similar a la ansiedad utilizando la prueba del laberinto elevado, y encontramos un aumento significativo en el tiempo pasado en los brazos cerrados en las hembras tratadas con ceramidas ($p = 0,0293$) (Figura 4a), sin diferencias significativas en el tiempo pasado en los brazos abiertos (Figura 4b) ni en el número total de entradas (Figura 4c). La administración de ceramidas en ratones macho no mostró diferencias significativas en los parámetros de comportamiento similar a la ansiedad (4a,b,c).

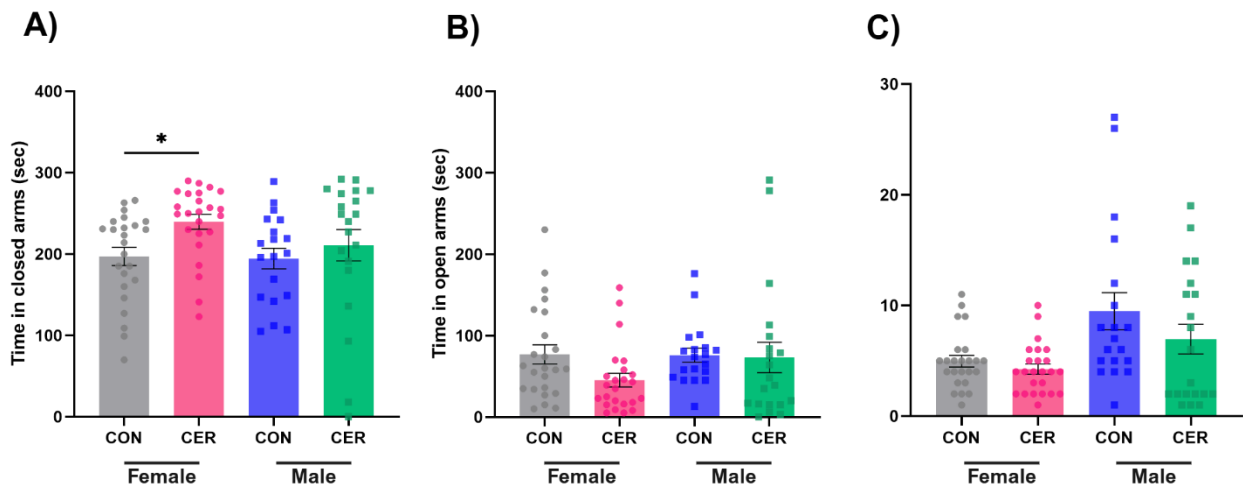


Figura 4. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en el laberinto elevado. A) El tratamiento con ceramidas aumentó significativamente el tiempo que las hembras pasaron en los brazos cerrados del laberinto elevado. No se observaron diferencias significativas en los machos. B) No se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos en el tiempo pasado en los brazos abiertos. C) En cuanto al número de entradas no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos analizados. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre los grupos * $p < 0.05$. Para hembras CON ($n = 24$), CER ($n = 24$), machos CON ($n = 19$), CER ($n = 19$). Abreviaturas: CON: control; CER: ceramidas.

Los ratones macho y hembras administrados con ceramidas no mostraron alteraciones en la distancia total (Figura 5a), frecuencia en orillas (Figura 5b) ni tiempo de inmovilidad (Figura 5c) durante la prueba de campo abierto.

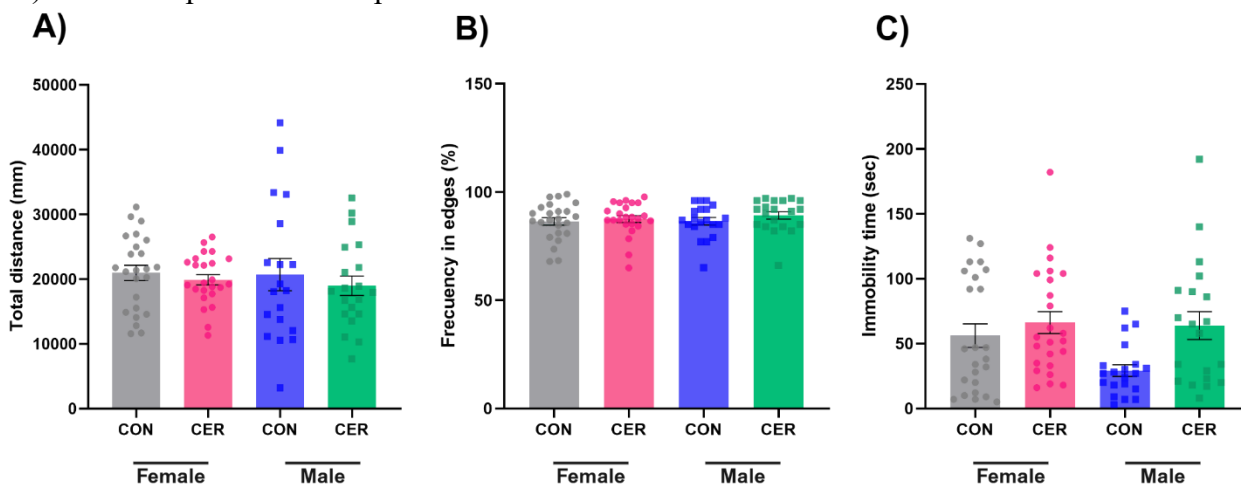


Figura 5. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en la prueba de campo abierto. A) No se observaron diferencias significativas respecto a la distancia total recorrida. B) La frecuencia en las orillas no mostró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos analizados. C) La diferencia en el tiempo de inmovilidad no fue significativa entre los cuatro grupos analizados. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre los grupos $*p < 0,05$. Para hembras CON (n = 24), CER (n = 24), machos CON (n = 19), CER (n = 19). Abreviaturas: CON: control; CER: ceramidas.

En la prueba de caja luz oscuridad encontramos que las hembras muestran un aumento significativo en la latencia para entrar por primera vez en el compartimento iluminado tras la administración intravenosa de las ceramidas ($p = 0,0116$) (Figura 6a). No se encontraron cambios significativos en el tiempo pasado en el compartimento iluminado tras la administración de ceramidas (Figura 6b). No observamos diferencias significativas ni en la latencia ni en el tiempo pasado en el compartimento en el grupo de machos expuestos a ceramidas (Figura 6a, b).

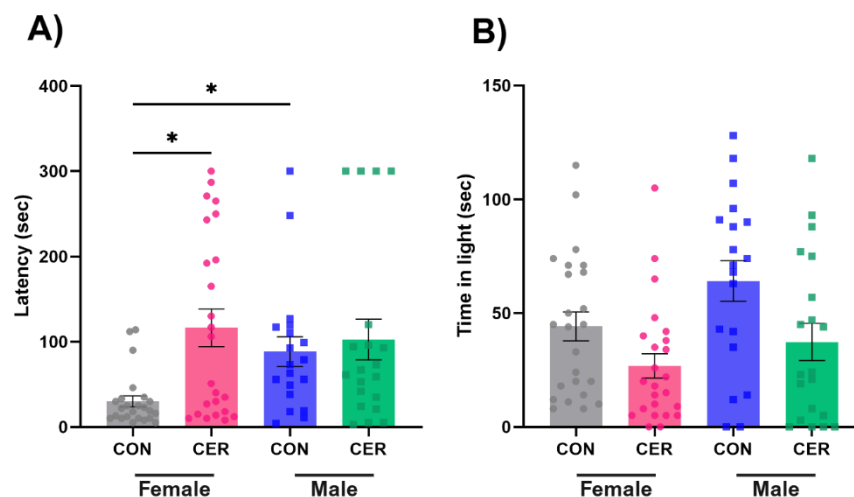


Figura 6. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en la caja de luz/oscuridad. A) Las hembras administradas con ceramidas muestra una latencia para entrar en el compartimento estadísticamente significativa mayor respecto al grupo control. B) No se observaron diferencias significativas en el tiempo pasado en el compartimento iluminado entre los cuatro grupos. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre los grupos * $p < 0,05$. Para hembras CON ($n = 24$), CER ($n = 24$), machos CON ($n = 19$), CER ($n = 19$). Abreviaturas: CON: control; CER: ceramidas.

En la prueba de alimentación novedosa suprimida encontramos que las hembras tratadas con el cóctel de ceramidas experimentaron una mayor latencia para alcanzar el pellet de comida en el centro de la arena ($p = 0,0381$) (Figura 7a), sin diferencias significativas en la latencia para comer ni en el consumo en su jaula (Figura 7b, c). En los machos no se observaron diferencias significativas en los parámetros analizados (Figura 7a, b, c).

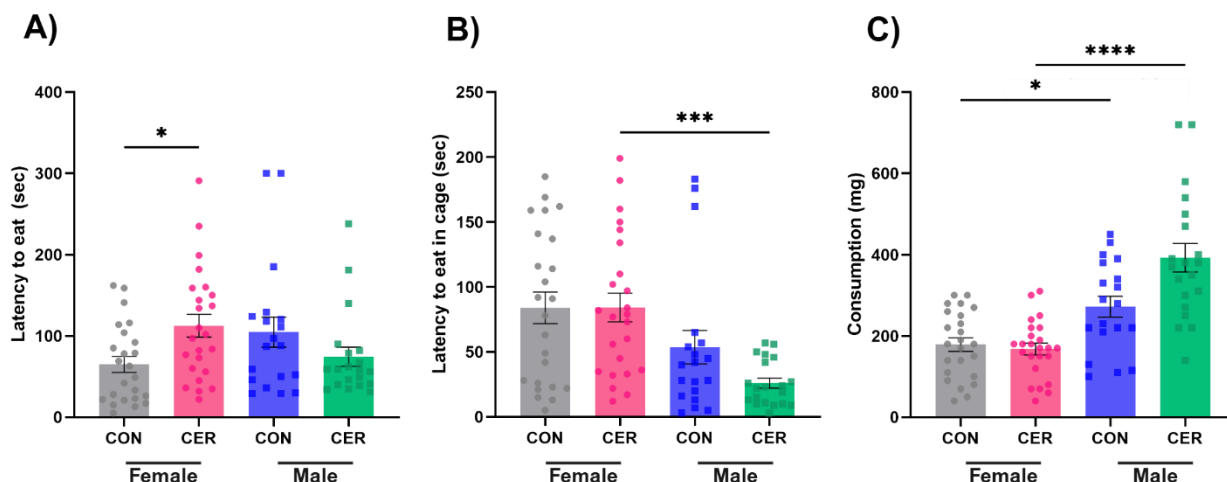


Figura 7. Efecto del tratamiento con ceramidas en la conducta similar a la ansiedad en la prueba de alimentación suprimida novedosa. A) Las hembras administradas con ceramidas muestran una latencia para alimentarse en el campo abierto significativamente mayor respecto al grupo control. B) Las hembras administradas con ceramida muestran una latencia significativamente mayor comparado con el grupo de machos. C) Se encontró un mayor consumo de alimento en jaula en el grupo de machos. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las diferencias entre los grupos * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Para hembras CON ($n = 24$), CER ($n = 24$), machos CON, ($n = 19$) CER ($n = 19$). Abreviaturas: CON: control; CER: ceramidas.

Finalmente, al calcular el Z-score de emocionalidad para cada prueba encontramos un aumento significativo en el grupo de hembras administradas con ceramidas en la prueba de laberinto elevado al compararlo con el grupo de hembras control ($p = 0,01$) y los machos que recibieron la mezcla de ceramidas ($p = 0,01$) (Figura 8a). En la prueba de campo abierto no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos analizados (Figura 8b). En la caja de luz oscuridad las hembras del grupo ceramidas muestran un score de emocionalidad significativamente mayor que las hembras control ($p = 0,0001$) y el grupo de machos ceramidas ($p = 0,0001$) (Figura 8c). Para la prueba de alimentación suprimida se observa un patrón similar, las hembras administradas con las ceramidas exhiben un score significativamente más alto que las hembras control ($p = 0,04$) y el grupo de machos que recibió la mezcla de ceramidas ($p = 0,001$) (Figura 8d). En conjunto, estos resultados demuestran que las ceramidas de cadena larga y muy

larga inducen un fenotipo similar a la ansiedad en ratones hembra.

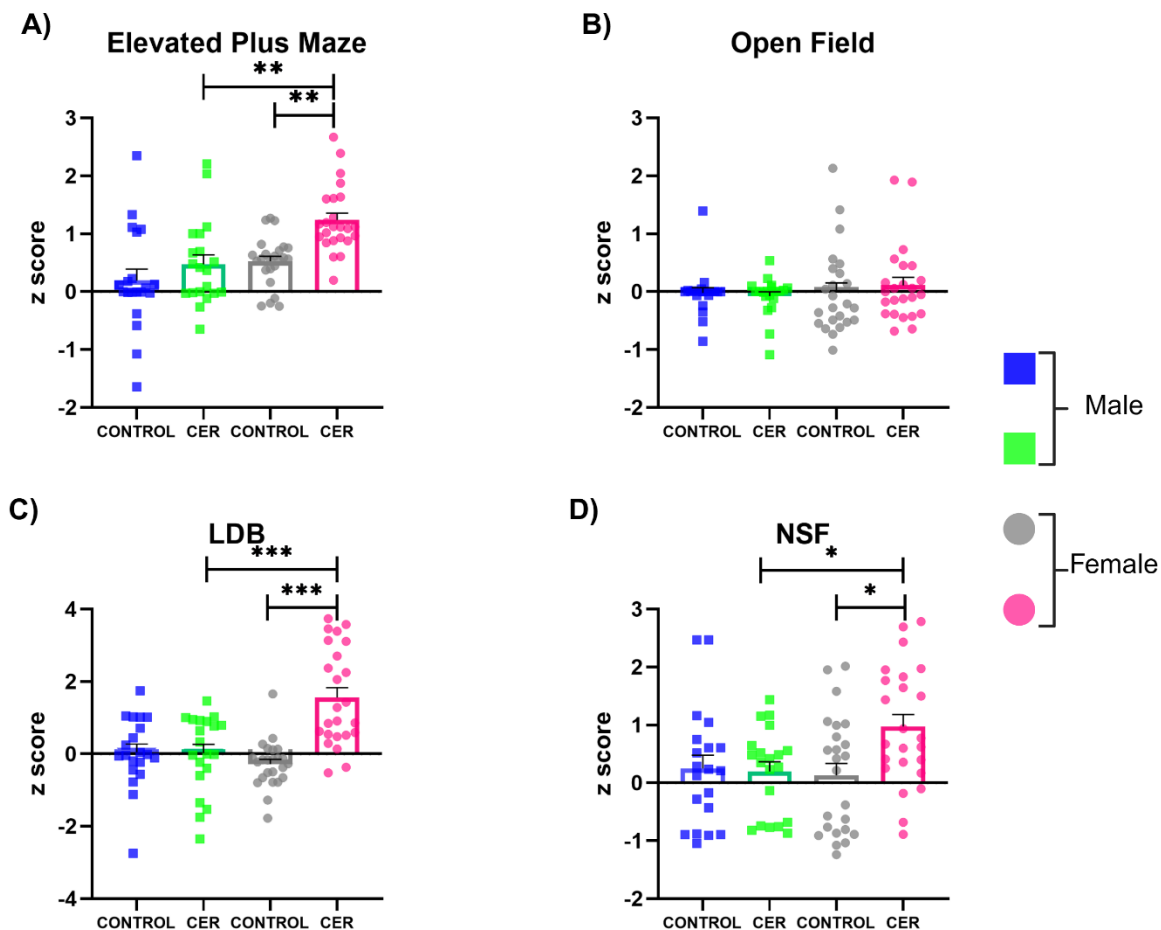


Figura 8. El tratamiento con ceramidas induce un fenotipo ansioso consistente en múltiples pruebas conductuales en las hembras administradas con ceramidas. A) Las hembras expuestas a la mezcla con ceramidas muestran un score de emocionalidad significativamente mayor en la prueba de laberinto elevado. B) No se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados en la prueba de campo abierto. C) Se encontró un score significativamente más alto en las hembras del grupo CER en la caja de luz oscuridad. D) Para la prueba de alimentación suprimida novedosa se observa un score de emocionalidad más alto en las hembras que recibieron la mezcla de ceramidas. Los datos se presentan como media $\pm$ SD. Se utilizó un ANOVA, post hoc Tukey para analizar las diferencias entre los grupos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Para hembras CONTROL ($n = 24$), CER ($n = 24$), machos CON ($n = 19$), CER ($n = 19$). Abreviaturas: CER: ceramidas; LDB: Light-Dark Box (caja de luz-oscuridad); NSF: Novelty-Suppressed Feeding (alimentación suprimida novedosa).

7.2 Las ceramidas modulan la activación microglial en la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado de ratones hembra con conducta similar a la ansiedad.

Para evaluar el efecto de la administración de ceramidas en el fenotipo microglial, se realizó un aislamiento de microglía proveniente de la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado utilizando un gradiente de densidad. Para cada región cerebral, se utilizó un pool de 6 ratones, resultando en una n final de 4. Los experimentos se llevaron a cabo exclusivamente en hembras, ya que estas mostraron un fenotipo similar a la ansiedad tras la administración de ceramidas. La fenotipificación se efectuó mediante el uso de marcadores específicos para identificar células microgliales y los fenotipos M1 y M2, incluyendo los marcadores anti-CD11b, CD86 y CD206. Encontramos que la administración de ceramidas no altera la población total de microglía CD11b+ en la CPF, el hipocampo y el cuerpo estriado (Figura 9a). La estimulación con ceramidas incrementó el fenotipo de microglía M1 CD86+ en la CPF de las hembras ($p = 0.0002$). El fenotipo CD86+ de la microglía no mostró cambios en el hipocampo ni en el cuerpo estriado (Figura 9b). Además, la administración de ceramidas promovió una disminución significativa del fenotipo de microglía M2 CD206+ en el hipocampo ($p = 0.0013$), el estriado ($p = 0.0034$) y la CPF ($p = 0.0007$) (Figura 9c). De acuerdo con estas observaciones, se puede concluir que las ceramidas de cadena larga modulan de forma selectiva los estados de activación de la microglía de manera específica para cada región cerebral.

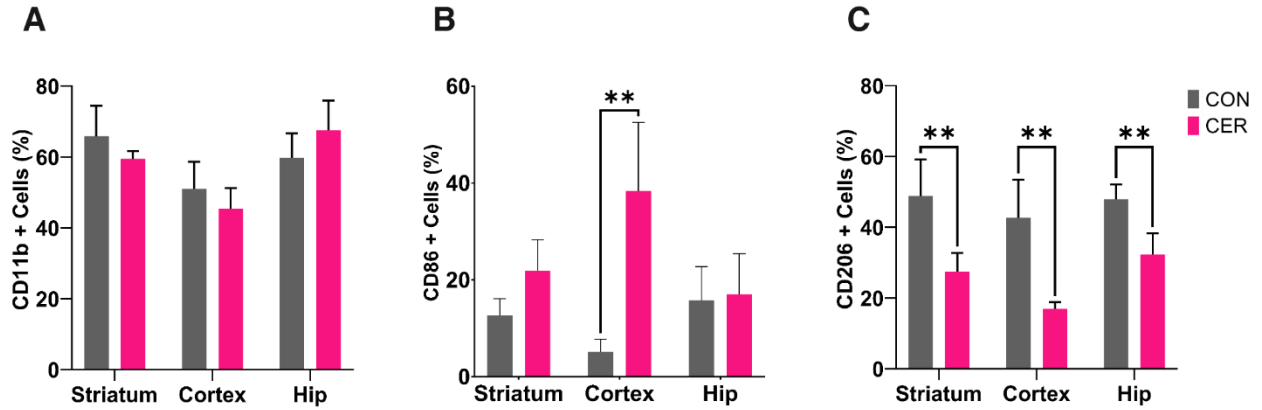


Figura 9. El tratamiento con ceramidas modifica el estado de activación de las células microgliales en hembras.

A) No se observaron cambios significativos en la población total de microglía (CD11b+). B) El tratamiento con ceramidas indujo un cambio en el fenotipo microglial, caracterizado por un incremento en la proporción de microglía proinflamatoria (CD86+) en la corteza, sin cambios en el cuerpo estriado y el hipocampo. C) Las hembras administradas con ceramida presentan una disminución de microglía antiinflamatoria (CD206+) en las tres regiones analizadas. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Para CON (n = 4) y CER (n = 4) correspondiente a un pool de 6 ratones por región cerebral, el análisis de citometría se realizó por duplicado. Abreviaturas: CON: control; CER: ceramidas; Striatum: cuerpo estriado; Hip: hipocampo.

7.3 La activación microglial M1 en corteza muestra una asociación inversa con la conducta tipo ansiosa en el grupo expuesto a las ceramidas.

Se construyó un modelo de regresión lineal múltiple para evaluar la asociación entre el fenotipo microglial y la intensidad de la conducta similar a la ansiedad, representada por el Z-score del laberinto elevado. Las variables predictoras incluidas fueron la proporción de microglía M1 en corteza y M2 en hipocampo (Figura 10). El modelo fue estadísticamente significativo (R^2 ajustado = 0.6329; $F = 9.622$; $p = 0.0016$, $\beta = -0.023$; IC 95%: -0.057 a 0.010), lo que indica que las variables explican un porcentaje considerable de la variabilidad en el comportamiento ansioso. En particular, se observó que en el grupo CER, la proporción de microglía M1 en corteza se asoció negativamente con el Z-score, es decir, a mayor activación microglial M1, menor intensidad de la conducta ansiosa, lo cual podría sugerir un posible papel compensatorio o una regulación diferencial de la respuesta inflamatoria en este grupo.

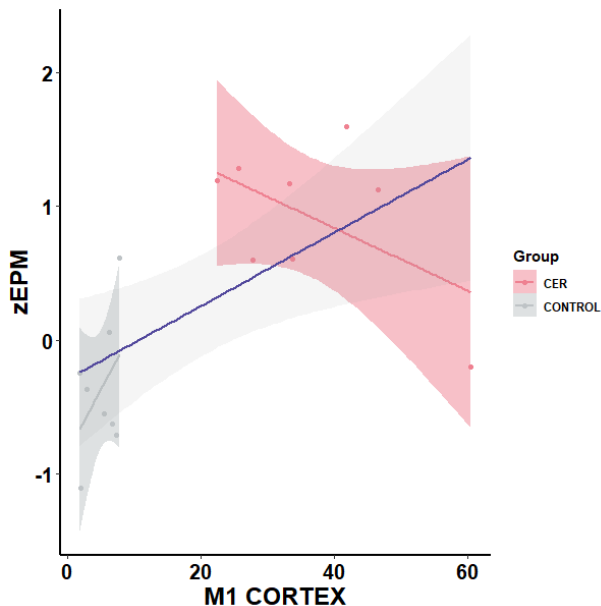


Figura 10. Relación entre la proporción de microglía M1 (CD86⁺) en corteza prefrontal y la conducta tipo ansiosa en la prueba de laberinto elevado. Se encontró una asociación inversa significativa en el grupo tratado con ceramidas, lo que sugiere un posible efecto modulador de la activación microglial cortical sobre el fenotipo ansioso. El modelo de regresión fue estadísticamente significativo (R^2 ajustado = 0,6329; $F = 9.622$; $p = 0,0016$). Se observó una tendencia negativa en la relación entre la proporción de CD86 y el Z-score en el laberinto elevado ($\beta = -0,023$; IC 95%: $-0,057$ a $0,010$). Abreviaturas: CER: ceramidas.

7.4 La estimulación con ceramidas de cadena larga aumenta la actividad fagocítica de la microglía in vitro.

Para evaluar si la estimulación con ceramidas coordina la fagocitosis microglial, utilizamos la línea celular SIM-A9 de microglía murina. Las células fueron incubadas durante 6 horas con ceramidas C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1. La fagocitosis se indujo mediante la adición de perlas de látex fluorescentes opsonizadas, y el porcentaje de células fluorescentes, correspondiente a aquellas que internalizaron las perlas, se determinó mediante análisis de citometría de flujo. Encontramos que la incubación con ceramidas promovió una mayor fagocitosis microglial, evidenciada por un aumento en el porcentaje de células FITC+ en comparación con el control de inflamación LPS ($p = 0,0001$) y el control ($p = 0,0001$) (Figura 11). Estos resultados indican que las ceramidas desempeñan un papel activo en la modulación de la capacidad fagocítica de la microglía, lo que podría estar relacionado con su función en procesos inflamatorios en el cerebro.

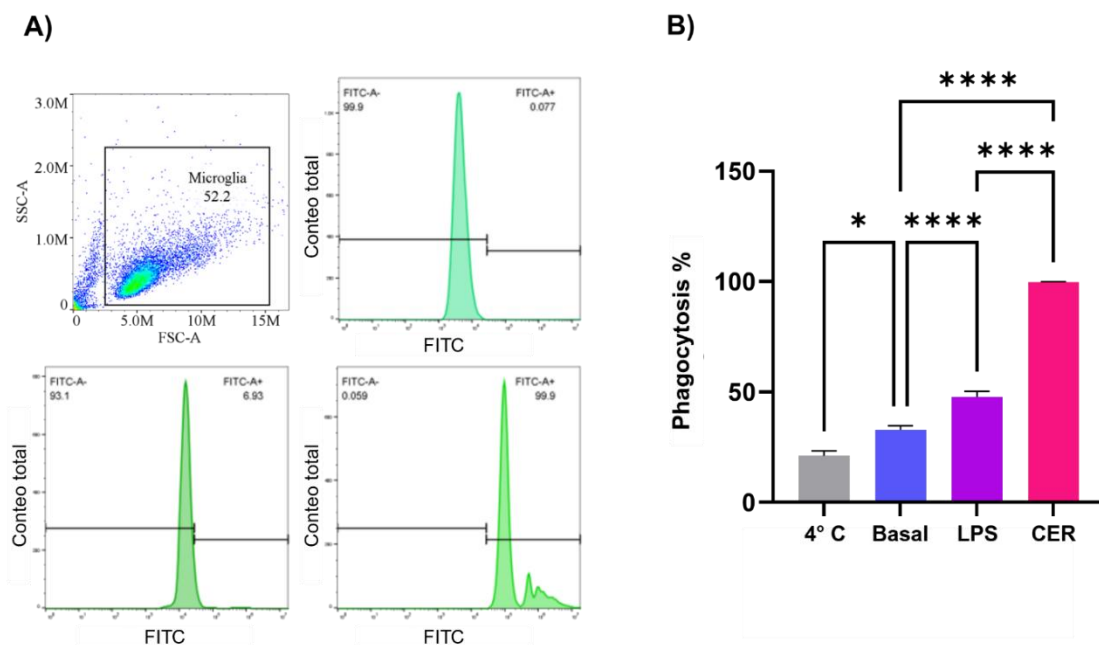


Figura 11. La estimulación con ceramidas aumenta la actividad fagocítica de la línea celular de microglía SIM-A9. A) Dot plot de la población celular analizada e histogramas representativo de la intensidad del marcador FITC. B) El tratamiento con ceramidas aumenta la fagocitosis de la microglía de forma significativa en comparación con las células en estado basal y estimuladas con LPS. Los resultados se expresan como media $\pm$ SD de tres experimentos independientes por triplicado. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA, post hoc Tukey * $p <$

0,05, **** $p < 0,0001$. Abreviaturas: CER: ceramidas; LPS: lipopolisacárido.

7.5 La estimulación con ceramidas de cadena larga y muy larga promueven la expresión de genes inflamatorios in vitro.

Evaluamos el efecto de la incubación con ceramidas en el perfil de expresión proinflamatorio de la línea celular mediante RT-qPCR. Observamos que las células tratadas con ceramidas mostraron un aumento significativo en la expresión de todos los genes evaluados en comparación con el grupo control (NLRP3, TNF- α , IL-1 β e IL-6). Sin embargo, la magnitud de la respuesta inflamatoria fue menor en comparación con el grupo estimulado con LPS (Figura 12). En detalle, el tratamiento con ceramidas indujo una sobreexpresión de NLRP3 14 veces respecto al control ($p = 0,001$) (Figura 12a) y TNF- α 17 veces ($p = 0,001$) (Figura 12b), mientras que IL-1 β y IL-6 mostraron aumentos de 22 ($p = 0,0001$) (Figura 12c) y 61 veces ($p = 0,01$) (Figura 12d), respectivamente. En contraste, la estimulación con LPS generó niveles de expresión considerablemente más altos para las mismas citocinas (NLRP3: 21 veces, TNF- α : 26 veces, IL-1 β : 250 veces, IL-6: 149 veces), lo cual fue estadísticamente significativo al comparar con las células tratadas con ceramidas ($p = 0,01$).

Estos resultados demuestran que la estimulación con ceramidas de cadena larga y muy larga induce un programa inflamatorio robusto en células microgliales, aunque menos intenso que el inducido por LPS. Lo anterior sugiere que las ceramidas modulan de forma selectiva vías inflamatorias específicas, apoyando su posible papel como mediadores lipídicos proinflamatorios en el contexto cerebral.

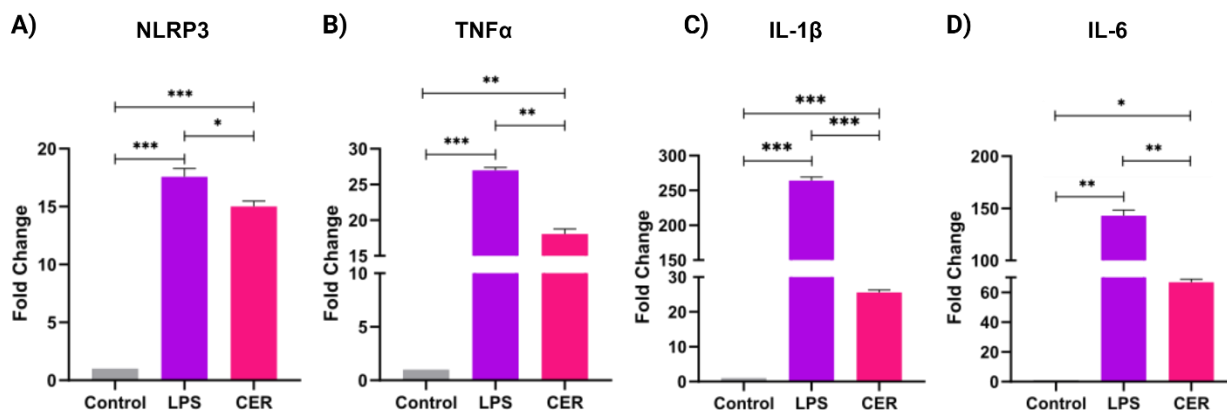


Figura 12. La estimulación con ceramidas incrementa la expresión de genes proinflamatorios en la línea celular de microglía SIM-A9. A) Se observa un aumento estadísticamente significativo en la expresión de NLRP3 en las células incubadas con ceramidas y LPS respecto al control B) El tratamiento con ceramidas aumento de forma significativa la expresión de TNF- α . C) Las células estimuladas con ceramida muestran un aumento en la expresión de IL-1 β . D) Las células tratadas con ceramidas presentan una mayor expresión de IL-6 respecto al control. Los resultados se expresan como media $\pm$ SD de tres experimentos independientes por duplicado. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA, post hoc Tukey * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abreviaturas: CER: ceramidas; LPS: lipopolisacárido.

7.6 La estimulación con ceramidas reduce el potencial de membrana mitocondrial y aumenta las especies reactivas de oxígeno citosólicas.

En el enfoque *in vitro* finalmente evaluamos si la estimulación con ceramidas (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1) desencadena la disfunción mitocondrial y la producción de ROS en microglía. Las células microgliales tratadas con ceramidas mostraron una reducción significativa en el potencial de membrana mitocondrial ($p = 0,0001$) (Figura 13a) y un aumento significativo en los niveles de ROS citosólicos ($p = 0,0001$) (Figura 13b). Los niveles de ROS mitocondriales no mostraron cambios tras la incubación con ceramidas (Figura 13c). Esta evidencia sugiere que las ceramidas promueven estrés oxidativo mediante la generación de ROS en el citoplasma.

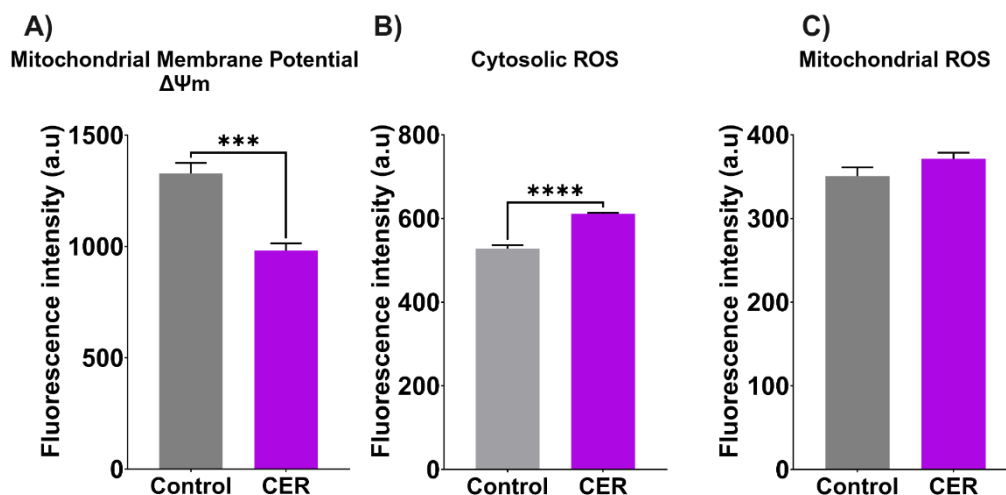


Figura 13. La estimulación con ceramidas promueve una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y estrés oxidativo en la línea de microglía SIM-A9. A) Las células tratadas con ceramidas muestran una reducción significativa del potencial de membrana mitocondrial. B) La incubación con ceramidas aumenta de forma estadísticamente significativa la presencia de ROS en el citoplasma. C) No se observaron cambios significativos en las especies reactivas mitocondriales. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de dos experimentos independientes por sextuplicado. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Abreviaturas: CER: ceramidas; ROS: especies reactivas de oxígeno.

7.7 Características de la población de estudio.

Para traducir los hallazgos en el modelo animal al contexto clínico se analizaron muestras de plasma de sujetos con trastorno de ansiedad para explorar si las alteraciones inflamatorias y lipídicas también estaban presentes a nivel periférico. La muestra total incluyó a 34 participantes, divididos en dos grupos: 17 sujetos control y 17 sujetos con diagnóstico de trastorno de ansiedad. En ambos grupos se incluyeron 3 hombres y 14 mujeres, con edades comprendidas entre 21 y 27 años, todos físicamente sanos. El grupo control estuvo compuesto por participantes sin diagnóstico psiquiátrico ni sintomatología ansiosa al momento de la recolección de la muestra, lo cual fue confirmado mediante la aplicación de tres instrumentos clínicos: CGI-S, GAD-7 y BAI. Por otro lado, los 17 sujetos del grupo clínico presentaban síntomas ansiosos al momento de la evaluación, y contaban con un diagnóstico confirmado de trastorno de ansiedad por un especialista en psiquiatría. La severidad de los síntomas se clasificó en tres niveles según los puntajes combinados de los instrumentos aplicados: 10 sujetos presentaron ansiedad leve, 4 ansiedad moderada y 3

ansiedad severa.

7.8 Los sujetos con trastorno de ansiedad presentan un perfil proinflamatorio sistémico.

Se evaluaron los niveles de citocinas IL-10, IL17A, IL-1 β , IL-6, IL-7, MCP1, TNF α en plasma de sujetos con trastorno de ansiedad y controles sanos. Los análisis indicaron que, en comparación con el grupo control, los sujetos con ansiedad presentaron una tendencia general hacia el incremento de las citocinas proinflamatorias (Figura 14). Se observó un aumento significativo en los niveles de IL-6 ($p = 0,0001$) (Figura 14d), MCP1 ($p = 0,0001$) (Figura 14f) y TNF- α ($p = 0,0001$) (Figura 14g) en el grupo con ansiedad, mientras que IL-1 β mostró una tendencia al alza sin alcanzar significancia estadística (Figura 14c). En contraste, los niveles de IL-17A se encontraron significativamente disminuidos ($p = 0,01$) (Figura 14b) en los sujetos con ansiedad en comparación con los controles. Estos hallazgos sugieren una activación parcial del perfil inflamatorio sistémico en sujetos con sintomatología ansiosa, siendo MCP1 la citocina con mayor diferencia entre condiciones.

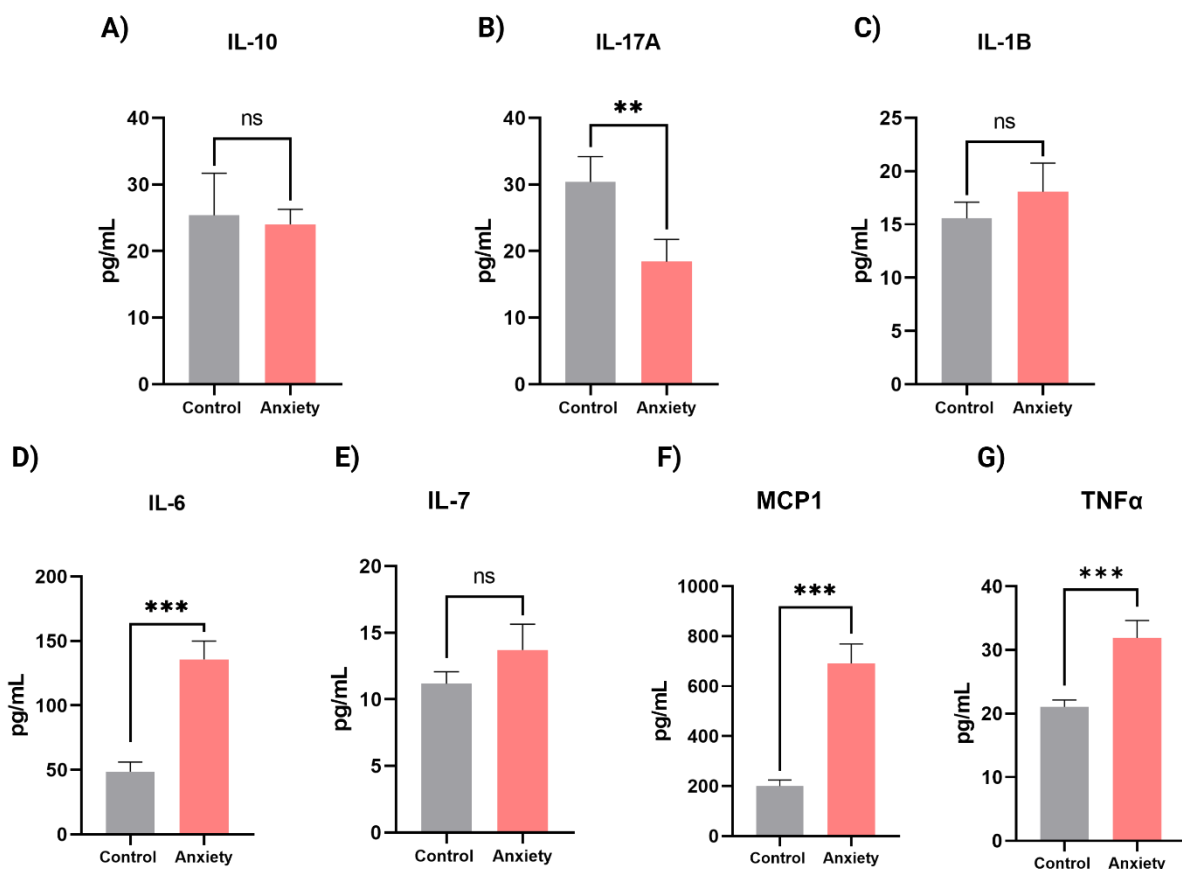


Figura 14. Alteración en el perfil de citocinas plasmáticas en sujetos con trastorno de ansiedad. A) No se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de IL-10. B) Los sujetos con ansiedad muestran una disminución significativa de IL-17A. C) Se observa una tendencia al alza de la IL-1β en los sujetos con ansiedad. D) Se encontró un aumento significativo de IL-6 en sujetos con ansiedad. E) No se encontraron cambios en los niveles de IL-7. F) Los niveles de MCP1 plasmáticos fueron mayores en los sujetos con ansiedad. G) Se observaron mayores niveles de TNFα en los sujetos con ansiedad. Los resultados se expresan como media ± SEM. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student o U de Mann-Whitney dependiendo de su distribución **p < 0,01, ***p < 0,001. Para Control (n = 17), Anxiety (n = 17). Abreviaturas: IL: Interleucina; MCP1: Monocyte chemoattractant protein-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1); TNFα: Tumor necrosis Factor α (Factor de Necrosis Tumoral α).

7.9 El perfil lipidómico plasmático en sujetos con ansiedad muestra disminución en diacilglicerol, lisofosfatidilcolina y triglicéridos.

Se realizó un análisis lipidómico dirigido en muestras de plasma para evaluar el perfil de esfingolípidos y otras clases lipídicas en sujetos con ansiedad. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de ceramidas, dihidroceramidas,

hexosilceramidas ni lactosilceramidas entre los grupos (Figura 15). En contraste, se observó una disminución significativa en los niveles de diacilglicerol 18:2/22:4 ($p = 0,004$) y 18:2/22:6 ($p = 0,02$), lisofosfatidilcolina 24:1 ($p = 0,03$) y triacilglicerol 60:11 FA 22:5 ($p = 0,04$) en los sujetos con ansiedad en comparación con los controles (Figura 16).

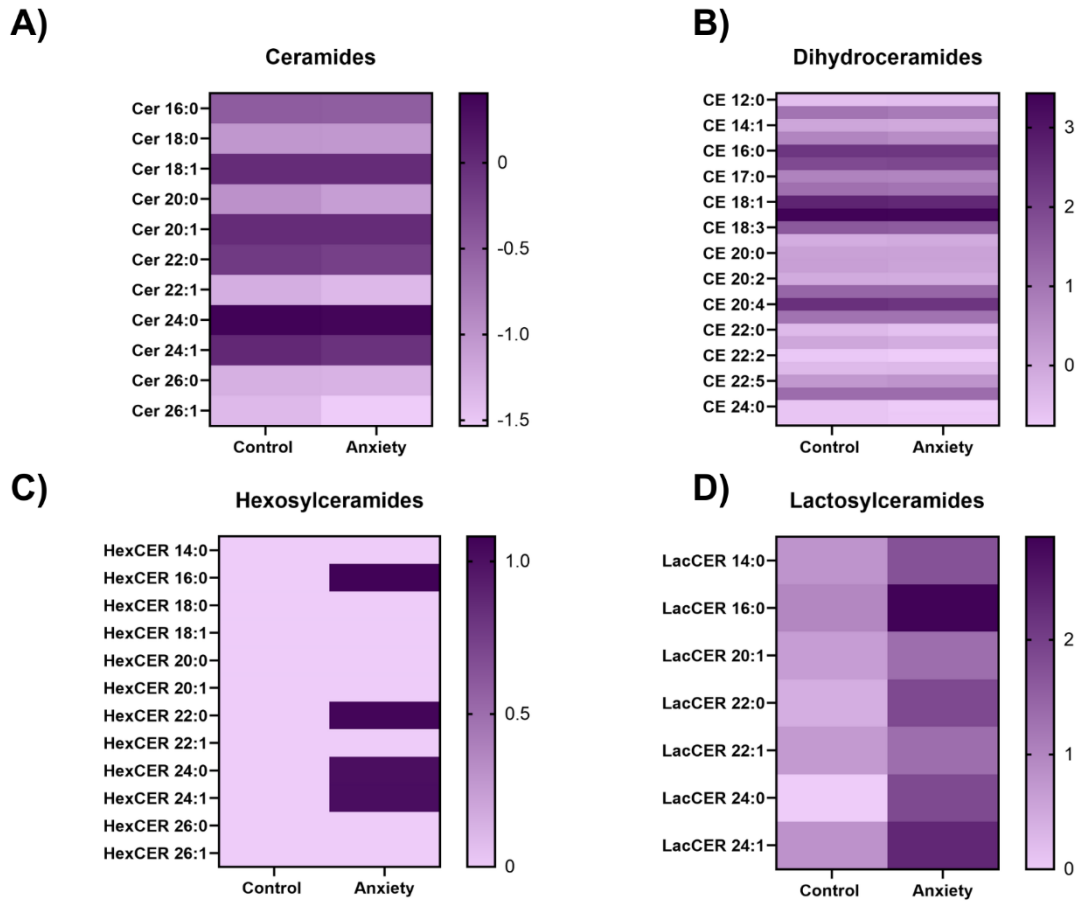


Figura 15. Perfil de ceramidas y sus derivados en plasma de sujetos con trastorno de ansiedad y controles sanos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos control y ansiedad en las especies analizadas de A) ceramidas, B) dihidroceramidas, C) hexosilceramidas y D) lactosilceramidas. Los resultados se expresan en $\log^{10}$ de $\text{nmol}/\mu\text{L}$. diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student o U de Mann-Whitney dependiendo de su distribución. Para Control ($n = 17$) y Anxiety ($n = 17$). Abreviaturas: Cer: ceramidas; CE: dihidroceramidas; HexCER: hexosilceramidas; LacCER: lactosilceramidas.

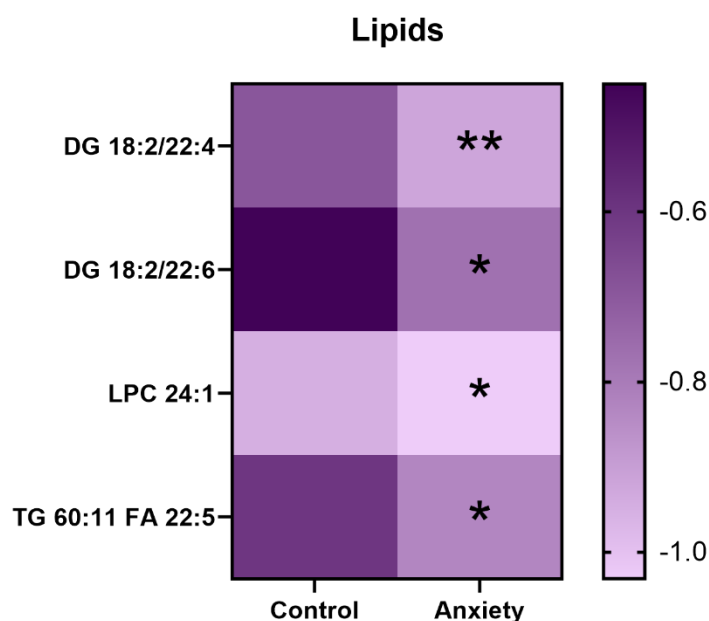


Figura 16. Reducción en los niveles plasmáticos de diglicéridos, lisofosfatidilcolinas y triglicéridos en sujetos con ansiedad. Se observó una disminución significativa en los niveles de DG 18:2/22:4, DG 18:2/22:6, LPC 24:1 y TG 60:11 FA 22:5 en los sujetos con ansiedad en comparación con controles. Los resultados se expresan en $\log^{10}$ de nmol/ μ L. diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student o U de Mann-Whitney dependiendo de su distribución. Para Control (n = 17) y Anxiety (n = 17). Abreviaturas: DG, diglicéridos; LPC, lisofosfatidilcolina; TG, triglicéridos; FA, ácido graso.

7.10 Las concentraciones plasmáticas de ceramidas no se asocian con el puntaje de ansiedad.

Se exploró la relación entre las concentraciones plasmáticas de ceramidas y el puntaje de ansiedad con el fin de identificar posibles asociaciones entre estos lípidos y la sintomatología ansiosa. Los análisis se realizaron para las ceramidas saturadas C16:0, C18:0, C22:0, C24:0, así como para la especie monounsaturada C24:1 (Figura 17). En todos los casos, los modelos lineales ajustados mostraron interceptos significativos, lo que indica que las especies lipídicas fueron detectadas de manera consistente en la cohorte. Sin embargo, los coeficientes de pendiente (β) asociados al puntaje de ansiedad no alcanzaron significancia estadística ($p > 0.09$ en todos los modelos).

En términos específicos, las ceramidas de cadena larga (C16:0 y C18:0) no mostraron una

relación positiva o negativa clara con el puntaje de ansiedad. De forma similar, las especies de cadena muy larga C22:0, C24:0 y C24:1 tampoco presentaron asociaciones significativas. En conjunto, estos resultados sugieren que, a diferencia de lo observado con otras clases lipídicas y mediadores inflamatorios, las ceramidas plasmáticas no constituyen un biomarcador directo de la sintomatología ansiosa en los sujetos evaluados.

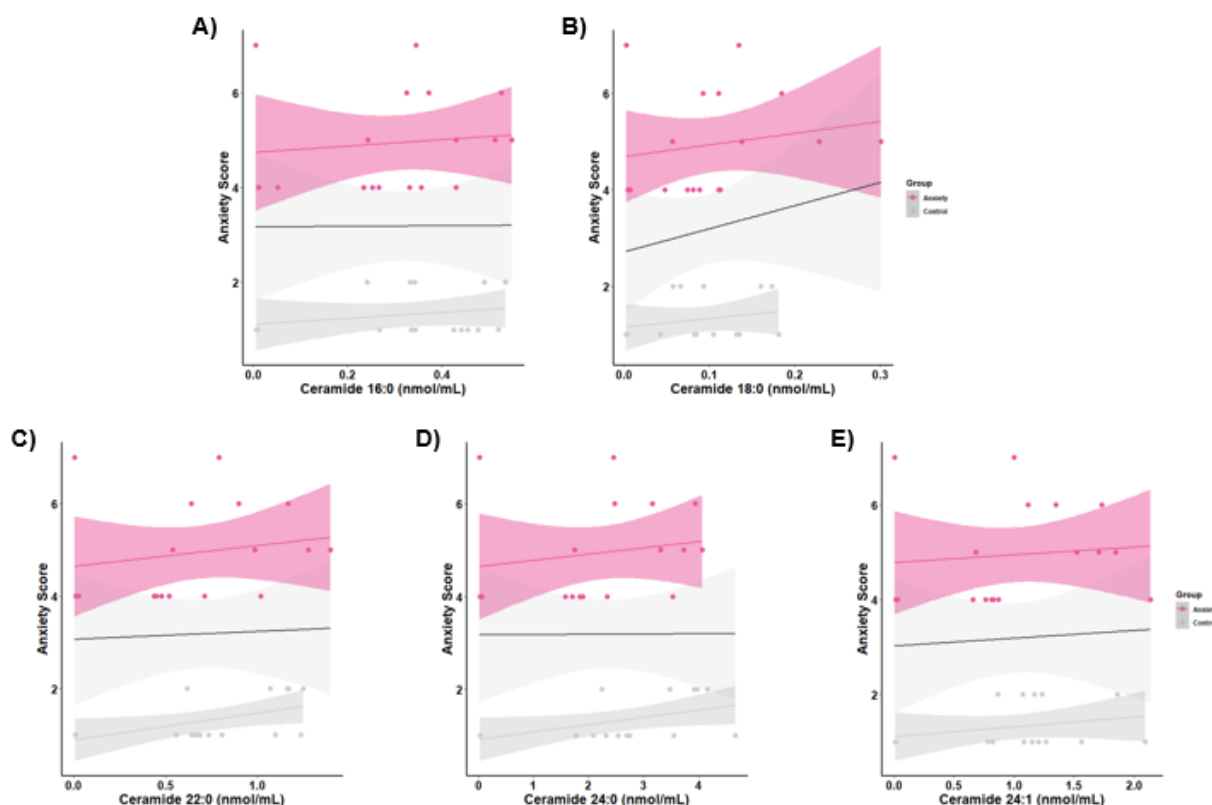


Figura 17 Relación entre las concentraciones plasmáticas de ceramidas y el puntaje de ansiedad en sujetos con trastorno de ansiedad y controles sanos. A) Modelo con DG 18:2/22:4. B) Modelo con DG 18:2/22:6. C) Modelo con LPC 24:1. D) Modelo con TG 60:11 FA 22:5. Ninguno de los modelos mostró asociaciones significativas entre las concentraciones plasmáticas de estas especies lipídicas y el puntaje de ansiedad ($p > 0,09$). Las líneas representan los ajustes por grupo; las bandas de color indican los intervalos de confianza al 95 %. Abreviaturas: DG, diacilglicerol; LPC, lisofosfatidilcolina; TG, triacilglicerol; FA, ácido graso.

Posteriormente se analizó la asociación entre las especies lipídicas diferencialmente expresadas en plasma y el puntaje de ansiedad en los sujetos evaluados (Figura 18). En el caso de los diacilgliceroles DG 18:2/22:4 y DG 18:2/22:6, no se observaron correlaciones significativas

con los niveles de ansiedad ($p = 0,09$ y $p = 0,14$, respectivamente), lo que sugiere que la reducción observada en estas especies lipídicas en el grupo con ansiedad no se traduce en una relación lineal con la intensidad de los síntomas. De manera similar, los niveles plasmáticos de lisofosfatidilcolina 24:1 ($p = 0,13$) y triglicérido 60:11 FA 22:5 ($p = 0,38$) tampoco mostraron una asociación significativa con la sintomatología ansiosa.

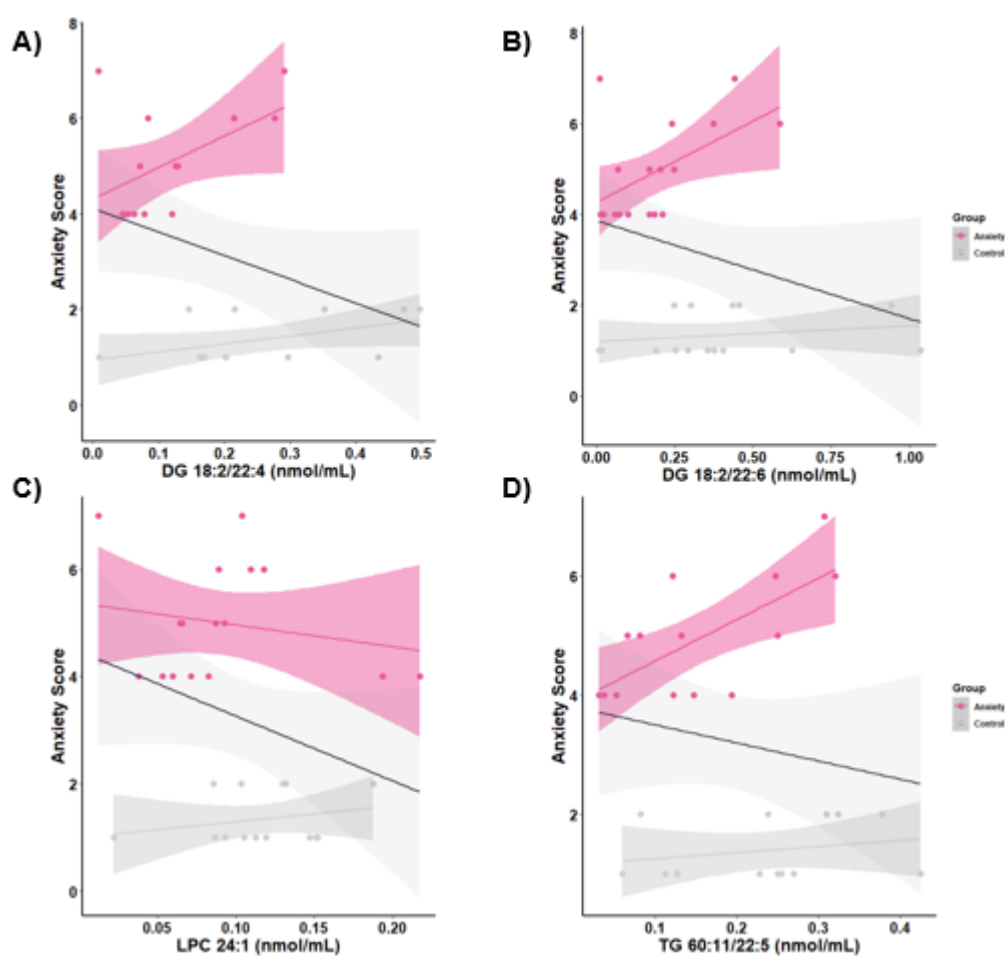


Figura 18. El fenotipo ansioso no muestra asociación significativa con especies lipídicas plasmáticas diferencialmente expresadas. A) Modelo con DG 18:2/22:4. B) Modelo con DG 18:2/22:6. C) Modelo con LPC 24:1. D) Modelo con TG 60:11 FA 22:5. Ninguno de los modelos mostró asociaciones significativas entre las concentraciones plasmáticas de estas especies lipídicas y el puntaje de ansiedad ($p > 0,09$). Las líneas representan los ajustes por grupo; las bandas de color indican los intervalos de confianza al 95 %. Abreviaturas: DG, diacilglicerol; LPC, lisofosfatidilcolina; TG, triacilglicerol.

Estos resultados sugieren que, aunque estas especies lipídicas se encuentran reducidas en los sujetos con ansiedad, su variabilidad individual no se asocia directamente con la magnitud del puntaje de ansiedad reportado. Esto podría deberse a que la contribución de estos lípidos al fenotipo ansioso no depende de sus niveles circulantes aislados, sino de su integración en redes metabólicas más amplias. Asimismo, es posible que factores clínicos o biológicos adicionales, como el estado inflamatorio, la regulación hormonal o la distribución tisular de los lípidos, modulen la relación entre estas especies y la ansiedad.

8. DISCUSIÓN

Las ceramidas son factores clave en la regulación funcional de órganos metabólicamente relevantes, como el tejido adiposo, el hígado, el músculo y el cerebro (Bikman & Summers, 2011). En este proyecto, evaluamos la participación de las ceramidas en la conducta similar a la ansiedad. Identificamos que las ceramidas de cadena larga y muy larga promueven un comportamiento similar a la ansiedad de manera dependiente del sexo, observándose mayor susceptibilidad en las hembras. Además, observamos que las ceramidas inducen cambios en el fenotipo microglial, aumentando el número de células CD86+ y reduciendo las células CD206+ en la corteza prefrontal de las hembras. Finalmente, los experimentos *in vitro* confirmaron que las ceramidas favorecen un fenotipo proinflamatorio en la microglía, aumentando la fagocitosis e incrementando la expresión de genes proinflamatorios como NLRP3 y TNF- α , así como alteraciones en la función mitocondrial, reflejadas en la pérdida del potencial de membrana y la acumulación de especies reactivas de oxígeno citosólicas. Esta evidencia respalda la noción de que las ceramidas modulan la actividad microglial y están asociadas con comportamientos similares a la ansiedad.

Las alteraciones en el metabolismo de los esfingolípidos, incluidas las ceramidas, se han relacionado con trastornos de ansiedad en humanos. Por ejemplo, la acumulación de esfingomielina C16:0 y ceramida C20:0 (Demirkan et al., 2013), así como niveles elevados de N-(hexadecanoil)-deoxyesfingo-4-enina-1-sulfonato en plasma (Dong et al., 2021), se correlacionan con un aumento en los diagnósticos de ansiedad. Xing y colaboradores (2016) reportaron que los niveles elevados de ceramida C18:0 están positivamente correlacionados con puntajes más altos en el Inventario Neuropsiquiátrico en pacientes con Parkinson, en los que la ansiedad es una comorbilidad común.

Para caracterizar el efecto de las ceramidas en la inducción de un fenotipo similar a la ansiedad, inyectamos a los ratones por vía intravenosa con ceramidas de cadena larga y muy larga.

Nuestros resultados confirmaron que la administración sistémica de ceramidas de cadena larga y muy larga contribuye al desarrollo de un fenotipo similar a la ansiedad en hembras. Estudios previos han documentado niveles elevados de ceramidas C16:0, C18:1, C22:1 y C26:1 en la corteza prefrontal y el hipocampo en modelos murinos con ansiedad inducida por estrés (Oliveira et al., 2016). Además, se ha identificado que una reducción en la expresión de ceramidasa alcalina 2 (ACER2), una enzima responsable de la degradación de ceramidas podría conducir a la acumulación de ceramidas y aumentar la susceptibilidad de los ratones a desarrollar un fenotipo similar a la ansiedad (Yang et al., 2020). En un estudio posterior se demostró que la administración sistémica de un cóctel de ceramidas (C16:0, C18:0, C22:0, C24:0 y C24:1) en ratones genera un comportamiento similar a la ansiedad tan solo 24 horas después de la inyección (Schumacher, Edwards, et al., 2022). El mismo grupo de trabajo reportó que el tratamiento con anticuerpos anti-ceramidas antes de la administración de exosomas enriquecidos con ceramida previene el desarrollo del comportamiento similar a la ansiedad en un modelo murino (Schumacher, Carpinteiro, et al., 2022). Estos estudios refuerzan la noción de que la acumulación de ceramidas de cadena larga y muy larga puede actuar como un factor causal clave en la aparición y mantenimiento de fenotipos ansiosos en modelos murinos.

Además de su rol estructural de las membranas celulares y mitocondriales, las ceramidas son reguladores críticos del metabolismo celular y modulan las respuestas inflamatorias (Farooqui & Farooqui, 2024). En el SNC, la microglía representa el principal tipo de células inmunitarias innatas, encargadas de monitorear su entorno en busca de amenazas potenciales, adoptando fenotipos específicos en función de su microambiente (Paolicelli et al., 2022). La clasificación más simplificada divide a la microglía en dos tipos principales: M1, con un fenotipo proinflamatorio y neurotóxico caracterizado por la expresión de CD86, CD16, Iba-1, CD14, CD40 y MHCII; y M2,

con un fenotipo antiinflamatorio y neuroprotector asociado a la expresión de CD206 y CD136 (Jurga et al., 2020). En este trabajo, caracterizamos el efecto de las ceramidas en el fenotipo microglial y encontramos que la administración de ceramidas de cadena larga y muy larga modula la activación microglial de forma específica para cada región cerebral. Esto se evidencia por el aumento de microglías CD86+ en la corteza y la reducción de microglías CD206+ en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza de las hembras. Diversos estudios preclínicos han confirmado que la acumulación cerebral de ceramidas de cadena larga y muy larga correlaciona con la activación microglial y comportamientos ansiosos en ratones. Por ejemplo, en un modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer con la mutación APOE4, se reportaron niveles elevados de ceramidas C20:0 y C22:0 en la corteza, lo cual se correlaciona con comportamientos ansiosos en hembras (Crivelli et al., 2022). La ablación de la ceramidasa ácida induce la acumulación de C16:0 en el cerebelo, la corteza, los núcleos paraventriculares y mediales del tálamo, además de aumentar la ceramida C18:0 en los núcleos septales y el cuerpo calloso, lo que genera un fenotipo similar a la ansiedad (Sikora et al., 2017). De interés, los ratones exhiben un aumento de células microgliales CD68+ en la materia gris cortical y subcortical (Sikora et al., 2017). La ablación de CerS2 aumenta las ceramidas C18:0 y C20:0, lo que se asocia con un aumento en el número de células microgliales CD68+ y disminución de marcadores de un fenotipo en reposo, como TMEM119 y P2RY12, en ratones (Teo et al., 2023). El tratamiento sistémico con el inmunomodulador FTY720 (Fingolimod) disminuye los niveles de C16:0, C18:0, C20:0 y C24:1, y reduce la presencia de microglía CD86+ en la corteza, atenuando el comportamiento similar a la ansiedad en ratones (Crivelli et al., 2022). En conjunto, estos resultados sugieren que las ceramidas son moduladores clave de la activación microglial y la respuesta inflamatoria, y respaldan su papel en la regulación de procesos neuroinmunes asociados con la ansiedad.

La microglía son células inmunitarias fagocíticas especializadas en el cerebro que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la salud cerebral, eliminando células apoptóticas, proteínas mal plegadas y patógenos, además de contribuir en la poda sináptica, dando forma a la estructura y función del cerebro (Galloway et al., 2019). Nuestro análisis *in vitro* mostró que las células microgliales incubadas con ceramidas de cadena larga y muy larga exhibieron una mayor fagocitosis. Anteriormente se ha descrito que las ceramidas C16:0, C18:0, C24:0 y C24:1 están asociadas con la sobreexpresión del marcador fagocítico CD68 (Sikora et al., 2017; Teo et al., 2023) y un aumento en la fagocitosis microglial (Robb et al., 2024). Aunque los mecanismos moleculares a través de los cuales las ceramidas modulan la fagocitosis microglial aún no se han explorado completamente, investigaciones recientes utilizando modelos murinos preclínicos destacan el papel de las ceramidas en la regulación de la función microglial. Por ejemplo, en un modelo murino de la enfermedad de Gaucher, el cual es causado por mutaciones en la enzima responsable de degradar el β -glucosilceramida (β -GlcCer) causando la acumulación de β -GlcCer, se observa una fagocitosis microglial aumentada de neuronas vivas a través de receptores de lectinas tipo C (Shimizu et al., 2023). Además, en modelos murinos de Niemann-Pick, un trastorno neurodegenerativo raro caracterizado por la acumulación masiva de colesterol y esfingolípidos en los lisosomas, las células microgliales presentan un fenotipo activado, caracterizado por una mayor proliferación, un soma agrandado, complejidad dendrítica reducida y una mayor expresión de TREM2, CD11b y CD68 (Rava et al., 2022). También, la ablación de la esfingosina 1-fosfato liasa que lleva a la acumulación de esfingosina 1-fosfato se asocia a un aumento de células microgliales CD68⁺ (Karunakaran et al., 2019)). Estos hallazgos sugieren que las ceramidas de cadena larga y muy larga y los metabolitos relacionados con las ceramidas modulan la fagocitosis microglial.

La inflamación es una característica común de muchos trastornos psiquiátricos en el cerebro

(Traetta et al., 2024). Como se mencionó anteriormente, las células microgliales son células inmunitarias especializadas que contribuyen a la respuesta inmune mediante la liberación de citocinas proinflamatorias en el cerebro (Salter & Stevens, 2017). Nuestro estudio *in vitro* demostró que la exposición a ceramidas aumenta la expresión de NLRP3 y TNF- α en las células microgliales. Se ha documentado previamente, que el análogo de ceramida C2 desencadena la formación del complejo NLRP3, lo que lleva al procesamiento y secreción de IL-1 β en microglía (Scheiblich et al., 2017) y macrófagos (Vandanmagsar et al., 2011). La ceramida C6:0 activa el inflamasoma NLRP3 a través del estrés oxidativo mitocondrial en monocitos derivados de médula ósea (Camell et al., 2015). Aunque no confirmamos la sobreexpresión de IL-1 β en nuestro experimento *in vitro*, el metabolismo intracelular de las ceramidas podría generar varias especies de ceramidas que modulan la expresión de citocinas. Por ejemplo, recientemente reportamos que los adipocitos derivados de células madre mesenquimales humanas tratados con ceramida 24:0 inducen la acumulación intracelular de C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C20:0, C22:0, C22:1, C24:0, C24:1, C25:0, C26:0 y C26:1 (Camacho-Morales et al., 2024). La acumulación de C16:0, C24:0 y C24:1 en el cerebro disminuye la expresión de IL-1 β e IL-6 en el hipotálamo mediobasal tras la estimulación con LPS (Robb et al., 2024). Además, metabolitos derivados de ceramidas, como esfingosina 1-fosfato o β -GlcCer, favorecen la expresión de TNF- α e IL-6 en microglías corticales (Karunakaran et al., 2019). Esta evidencia confirma que el metabolismo de las ceramidas podría generar especies lipídicas alternativas con el potencial de modular la activación transcripcional de vías inflamatorias en el cerebro.

Un número creciente de estudios sugiere una estrecha relación entre las ceramidas, la integridad y función mitocondrial (Fisher-Wellman et al., 2021), la respuesta inmune innata y los trastornos del estado de ánimo (Culmsee et al., 2019). Además, estudios preclínicos proporcionan

evidencia de que las mitocondrias desempeñan un papel crucial en los trastornos de ansiedad (Gebara et al., 2021; Hollis et al., 2015). Finalmente, determinamos el papel de las ceramidas de cadena larga y muy larga en la función mitocondrial y reportamos que el tratamiento con ceramidas de cadena larga y muy larga disminuye el potencial de membrana mitocondrial en células microgliales. No se han reportado datos sobre el efecto de las ceramidas en la función mitocondrial de las microglías. Sin embargo, la incubación con ceramida C2:0 en astrocitos desencadena la liberación de citocromo de las mitocondrias, lo que sugiere un fallo metabólico (Y. Wang et al., 2006). Además, la ceramida C2:0 reduce el potencial de membrana mitocondrial en linfocitos B (Kawabata et al., 1999). También reportamos que el tratamiento con ceramidas aumenta las especies reactivas de oxígeno citosólicas. De acuerdo con estudios previos la exposición a ceramida C2:0 en astrocitos primarios induce la liberación de ROS (Prasad et al., 2008), y la ceramida C6:0 favorece la formación de ROS a través de NADPH oxidasa en células de linfoma B (Villena et al., 2008). En macrófagos, la ceramida 1-fosfato desencadena la generación de ROS por NADPH oxidasa (Arana et al., 2012). Por el contrario, también se ha reportado que la ceramida C2:0 inhibe la producción de ROS mediante la supresión de NADPH oxidasa en microglías activadas por LPS (Jung et al., 2013). El aumento de ROS citosólico puede desencadenar una cascada de eventos de señalización que conducen a la activación de vías involucradas en respuestas inflamatorias, supervivencia y muerte celular programada (De Almeida et al., 2022). Por lo tanto, proponemos que las ceramidas podrían contribuir a la disfunción mitocondrial e influir potencialmente en los procesos inflamatorios.

Complementando los hallazgos obtenidos en el modelo murino, se evaluó el perfil inflamatorio y lipídico en plasma de sujetos diagnosticados con trastorno de ansiedad.

Los análisis indicaron que los sujetos con ansiedad presentaron un incremento significativo en las concentraciones de IL-6, MCP1 y TNF- α , además de una disminución significativa en IL-

17A. Estos hallazgos son congruentes con estudios previos que han demostrado una asociación entre trastornos de ansiedad y un perfil inflamatorio alterado. Por ejemplo, Tang et al. (2018) reportaron niveles elevados de IL-6, TNF- α e IL-1 β en pacientes con trastorno de ansiedad generalizada en comparación con controles sanos, sugiriendo una activación del sistema inmunológico en estos individuos. Asimismo, en pacientes con trastorno de ansiedad generalizada se ha reportado un aumento en IL-6, lo cual se correlaciono positivamente con el puntaje en la escala de ansiedad de Hamilton (HAM-A) (Zou et al., 2020). Además, se ha reportado un aumento de IL-6, TNF α e IL-17A en el suero de pacientes con artritis reumatoide que presentan sintomatología ansiosa (Y. Liu et al., 2012). Por otra parte, los niveles de IL-17A se han correlacionado positivamente con el score en el Inventario de Ansiedad Estado-Rasgo en mujeres con depresión y ansiedad post parto (Min et al., 2022). En sujetos con enfermedad coronaria los niveles de TNF α e IL-17A en suero se correlacionan positivamente con el score de ansiedad en la escala de ansiedad y depresión hospitalaria (Lu et al., 2022). En cuanto a MCP1, con anterioridad se ha reportado una correlación positiva de esta quimiocina con el score en la escala HAM-A en mujeres durante el tercer trimestre del embarazo (Camacho-Arroyo et al., 2021). En pacientes con trastorno por abuso de alcohol se ha reportado que mayores niveles de MCP1 plasmáticos se asocian a sintomatología ansiosa (Kazmi et al., 2022). En conjunto, estos datos refuerzan la idea de que la inflamación sistémica puede desempeñar un papel clave en la fisiopatología del trastorno de ansiedad y subrayan la relevancia clínica de los biomarcadores inmunológicos como herramientas potenciales para el monitoreo y eventual tratamiento de este tipo de trastornos.

En el análisis lipidómico mediante espectrometría de masas no se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de ceramidas entre los sujetos con ansiedad y los controles. Sin embargo, el análisis extendido reveló una disminución significativa en diglicéridos,

lisofosfatidilcolinas y triglicéridos en los sujetos con ansiedad, lo que indica que las alteraciones lipídicas en este trastorno no se limitan a la vía de las ceramidas, sino que podrían involucrar de manera más amplia el metabolismo de glicerolípidos y fosfolípidos. En este estudio, las concentraciones plasmáticas de ceramidas saturadas (16:0, 18:0, 22:0, 24:0) y de la especie monosaturada 24:1 no mostraron asociación con el puntaje de ansiedad. Un patrón similar se observó en las especies lipídicas que aparecieron diferencialmente expresadas —DG 18:2/22:4, DG 18:2/22:6, LPC 24:1 y TG 60:11 FA 22:5, a pesar de encontrarse disminuidas en los sujetos con ansiedad, sus niveles individuales no se relacionaron significativamente con la magnitud de los síntomas. Estudios previos han reportado un enriquecimiento de ceramidas de cadena muy larga en trastornos de ansiedad y estrés crónico. Por ejemplo, en pacientes con sintomatología ansiosa y enfermedad de Alzheimer se observan niveles elevados de diversas especies de ceramidas, incluyendo C14:0, C16:0, C18:0 y C24:1, en comparación con controles cognitivamente normales y sin ansiedad (Xing et al., 2016), lo que sugiere una alteración en el metabolismo de esfingolípidos asociada a síntomas neuropsiquiátricos. Asimismo, en pacientes con enfermedad de Parkinson, los niveles de esfingomielina 16:0 y ceramida C20:0 se correlacionaron con un mayor número de diagnósticos de ansiedad (Dong et al., 2021). Por otro lado, ya se han reportado asociaciones entre las concentraciones plasmáticas de esfingomielinas y fosfatidilcolinas con síntomas de depresión y ansiedad en población holandesa. Específicamente, la proporción de esfingomielinas y niveles de fosfatidilcolinas estaban inversamente correlacionados con las puntuaciones de síntomas ansiosos (Demirkan et al., 2013), sugiriendo que alteraciones en estos lípidos podrían estar implicadas en la fisiopatología de los trastornos de ansiedad. Las evidencias presentadas en conjunto con los resultados obtenidos respaldan la idea de que existen alteraciones específicas en el metabolismo de esfingolípidos en individuos con ansiedad. Aunque en este estudio no se detectaron diferencias significativas en las ceramidas plasmáticas, sí se observaron modificaciones

significativas en otras clases de lípidos. Esto sugiere que la desregulación metabólica asociada a la ansiedad puede ser heterogénea y estar influenciada por factores clínicos, poblacionales o metodológicos. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de ampliar la investigación hacia un espectro lipídico más amplio, con el fin de comprender de manera integral el eje lípidos-inflamación en la ansiedad.

En conjunto, los hallazgos de este trabajo respaldan la hipótesis de que las ceramidas de cadena larga y muy larga son moduladores clave de la interacción neuroinmune en el contexto de la ansiedad. Tanto en el modelo murino como en sujetos humanos con sintomatología ansiosa, se identificaron alteraciones específicas en el perfil lipídico y en el estado inflamatorio sistémico, apuntando hacia un eje funcional entre el metabolismo de esfingolípidos y la respuesta inmune.

9. CONCLUSIONES

La administración de ceramidas de cadena larga indujo un fenotipo conductual similar a la ansiedad en hembras, acompañado de alteraciones específicas en la activación microglial. En particular, se observó un aumento del fenotipo M1 en la corteza prefrontal y una disminución del fenotipo M2 en corteza, hipocampo y cuerpo estriado. Además, la proporción de microglía M1 en corteza mostró una asociación negativa con el puntaje de emocionalidad en el laberinto en cruz elevado, sugiriendo un vínculo entre la activación microglial proinflamatoria y la expresión de conductas ansiosas.

En condiciones *in vitro*, la estimulación con ceramidas promovió un perfil proinflamatorio caracterizado por un incremento en la actividad fagocítica y en la expresión de NLRP3, TNF- α e IL-6. Paralelamente, se observó un deterioro de la función mitocondrial evidenciado por la reducción del potencial de membrana y un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno citosólicas en la línea celular de microglía murina.

En humanos, los sujetos con trastorno de ansiedad presentaron niveles elevados de IL-6, MCP1 y TNF- α , junto con reducciones significativas en diacilgliceroles, triacilgliceroles y lisofosfatidilcolinas plasmáticas, lo que indica la presencia de un estado proinflamatorio sistémico y alteraciones metabólicas específicas.

En conjunto, estos hallazgos convergen en la propuesta de un eje lípidos-inflamación que vincula las ceramidas y otras especies lipídicas con la activación microglial, la disfunción mitocondrial y la inflamación sistémica, procesos que podrían contribuir de manera relevante a la manifestación y persistencia de la ansiedad.

10. PERSPECTIVAS

1. Analizar el efecto de la administración crónica de las ceramidas de cadena larga en la conducta y activación microglial
2. Evaluar individualmente cada especie de ceramida para identificar su impacto en el fenotipo ansioso.
3. Profundizar en el análisis de diferencias por sexo, considerando las respuestas observadas en hembras y machos.
4. Determinar la utilidad de las ceramidas plasmáticas, de manera aislada o en combinación con otras especies lipídicas, como biomarcadores de riesgo, diagnóstico o pronóstico en trastornos de ansiedad.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1538–1543. <https://doi.org/10.1038/nn2014>
- Albeituni, S., & Stiban, J. (2019). *Roles of Ceramides and Other Sphingolipids in Immune Cell Function and Inflammation* (pp. 169–191). https://doi.org/10.1007/978-3-030-21735-8_15
- Arana, L., Gangoiti, P., Ouro, A., Rivera, I. G., Ordoñez, M., Trueba, M., Lankalapalli, R. S., Bittman, R., & Gomez-Muñoz, A. (2012). Generation of reactive oxygen species (ROS) is a key factor for stimulation of macrophage proliferation by ceramide 1-phosphate. *Experimental Cell Research*, 318(4), 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.11.013>
- Bekhite, M., González-Delgado, A., Hübner, S., Haxhikadrija, P., Kretzschmar, T., Müller, T., Wu, J. M. F., Bekfani, T., Franz, M., Wartenberg, M., Gräler, M., Greber, B., & Schulze, P. C. (2021). The role of ceramide accumulation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes on mitochondrial oxidative stress and mitophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, 167, 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.016>
- Bernal-Vega, S., García-Juárez, M., & Camacho-Morales, A. (2023). Contribution of ceramides metabolism in psychiatric disorders. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 164, Issue 6, pp. 708–724). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.15759>
- Bickett, A., & Tapp, H. (2016). Anxiety and diabetes: Innovative approaches to management in primary care. *Experimental Biology and Medicine*, 241(15), 1724–1731. <https://doi.org/10.1177/1535370216657613>
- Bikman, B. T., & Summers, S. A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 121, Issue 11, pp. 4222–4230).

<https://doi.org/10.1172/JCI57144>

- Biswas, K. (2023). Microglia mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases: A review on the cell signaling pathways involved in microglial activation. *Journal of Neuroimmunology*, 383, 578180. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578180>
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 3–18. <https://doi.org/10.1111/nan.12011>
- Brazdis, R.-M., Zoicas, I., Kornhuber, J., & Mühle, C. (2024). Brain Region-Specific Expression Levels of Synuclein Genes in an Acid Sphingomyelinase Knockout Mouse Model: Correlation with Depression-/Anxiety-Like Behavior and Locomotor Activity in the Absence of Genotypic Variation. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16), 8685. <https://doi.org/10.3390/ijms25168685>
- Brodowicz, J., Przegaliński, E., Müller, C. P., & Filip, M. (2018). Ceramide and Its Related Neurochemical Networks as Targets for Some Brain Disorder Therapies. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 33, Issue 2, pp. 474–484). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9798-6>
- Camacho-Arroyo, I., Flores-Ramos, M., Mancilla-Herrera, I., Cruz, F. M. C., Hernández-Ruiz, J., Diaz, G. P., Labonne, B. F., del Pilar Meza-Rodríguez, M., & Gelman, P. L. (2021). Chemokine profile in women with moderate to severe anxiety and depression during pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12884-021-04225-2>
- Camacho-Morales, A., Noriega, L. G., Sánchez-García, A., Torre-Villalvazo, I., Vázquez-Manjarrez, N., Maldonado-Ruiz, R., Cárdenas-Tueme, M., Villegas-Romero, M., Alamilla-Martínez, I., Rodríguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Corona, J. C., Tovar, A. R., Saville, J.,

- Fuller, M., Gonzalez-Gonzalez, J. G., & Rivas-Estilla, A. M. (2024). Plasma C24:0 ceramide impairs adipose tissue remodeling and promotes liver steatosis and glucose imbalance in offspring of rats. *Heliyon*, *10*(20). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39206>
- Camell, C. D., Nguyen, K. Y., Jurczak, M. J., Christian, B. E., Shulman, G. I., Shadel, G. S., & Dixit, V. D. (2015). Macrophage-specific de Novo synthesis of ceramide is dispensable for inflammasome-driven inflammation and insulin resistance in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(49), 29402–29413. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680199>
- Chmielarz, M., Bromke, M. A., Olbromski, M., Środa-Pomianek, K., Frej-Mądrzak, M., Dzięgiel, P., & Sobieszczńska, B. (2024). Lipidomics Analysis of Human HMC3 Microglial Cells in an In Vitro Model of Metabolic Syndrome. *Biomolecules*, *14*(10), 1238. <https://doi.org/10.3390/biom14101238>
- Corbett, B. F., Luz, S., Arner, J., Pearson-Leary, J., Sengupta, A., Taylor, D., Gehrman, P., Ross, R., & Bhatnagar, S. (2019). Sphingosine-1-phosphate receptor 3 in the medial prefrontal cortex promotes stress resilience by reducing inflammatory processes. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10904-8>
- Crivelli, S. M., Luo, Q., Kruining, D. van, Giovagnoni, C., Mané-Damas, M., den Hoedt, S., Berkes, D., De Vries, H. E., Mulder, M. T., Walter, J., Waelkens, E., Derua, R., Swinnen, J. V., Dehairs, J., Wijnands, E. P. M., Bieberich, E., Losen, M., & Martinez-Martinez, P. (2022). FTY720 decreases ceramides levels in the brain and prevents memory impairments in a mouse model of familial Alzheimer's disease expressing APOE4. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *152*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113240>
- Cruz-Carrillo, G., Montalvo-Martínez, L., Cárdenas-Tueme, M., Bernal-Vega, S., Maldonado-Ruiz, R., Reséndez-Pérez, D., Rodríguez-Ríos, D., Lund, G., Garza-Ocañas, L., & Camacho-Morales, A. (2020). Fetal Programming by Methyl Donors Modulates Central Inflammation

- and Prevents Food Addiction-Like Behavior in Rats. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00452>
- Culmsee, C., Michels, S., Scheu, S., Arolt, V., Dannlowski, U., & Alferink, J. (2019). Mitochondria, microglia, and the immune system — How are they linked in affective disorders? *Frontiers in Psychiatry*, 10(JAN). <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00739>
- De Almeida, A. J. P. O., De Oliveira, J. C. P. L., Da Silva Pontes, L. V., De Souza Júnior, J. F., Gonçalves, T. A. F., Dantas, S. H., De Almeida Feitosa, M. S., Silva, A. O., & De Medeiros, I. A. (2022). ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/1225578>
- Demirkan, A., Isaacs, A., Ugocsai, P., Liebisch, G., Struchalin, M., Rudan, I., Wilson, J. F., Pramstaller, P. P., Gyllenstein, U., Campbell, H., Schmitz, G., Oostra, B. A., & van Duijn, C. M. (2013). Plasma phosphatidylcholine and sphingomyelin concentrations are associated with depression and anxiety symptoms in a Dutch family-based lipidomics study. *Journal of Psychiatric Research*, 47(3), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.11.001>
- Ding, S., Li, G., Fu, T., Zhang, T., Lu, X., Li, N., & Geng, Q. (2024). Ceramides and mitochondrial homeostasis. *Cellular Signalling*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2024.111099>
- Dong, M. X., Hu, L., Wei, Y. D., & Chen, G. H. (2021). Metabolomics profiling reveals altered lipid metabolism and identifies a panel of lipid metabolites as biomarkers for Parkinson's disease related anxiety disorder. *Neuroscience Letters*, 745. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135626>
- Ebel, P., Vom Dorp, K., Petrasch-Parwez, E., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Minich, D., Ginkel, C., Welcker, J., Degen, J., Eckhardt, M., Dere, E., Dörmann, P., & Willecke, K. (2013). Inactivation of ceramide synthase 6 in mice results in an altered sphingolipid

- metabolism and behavioral abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21433–21447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479907>
- Ennaceur, A., & Chazot, P. L. (2016). Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. *Pharmacology Research & Perspectives*, 4(2). <https://doi.org/10.1002/prp2.223>
- Faa, G., Manchia, M., Pintus, R., Gerosa, C., Marcialis, M. A., & Fanos, V. (2016). Fetal programming of neuropsychiatric disorders. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 108(3), 207–223. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21139>
- Farooqui, A. A., & Farooqui, T. (2024). Phospholipids, Sphingolipids, and Cholesterol-Derived Lipid Mediators and Their Role in Neurological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(19), 10672. <https://doi.org/10.3390/ijms251910672>
- Filiou, M. D., & Sandi, C. (2019a). Anxiety and Brain Mitochondria: A Bidirectional Crosstalk. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 42, Issue 9, pp. 573–588). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.07.002>
- Filiou, M. D., & Sandi, C. (2019b). Anxiety and Brain Mitochondria: A Bidirectional Crosstalk. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 42, Issue 9, pp. 573–588). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.07.002>
- Fisher-Wellman, K. H., Hagen, J. T., Neufer, P. D., Kassai, M., & Cabot, M. C. (2021). On the nature of ceramide-mitochondria interactions – Dissection using comprehensive mitochondrial phenotyping. In *Cellular Signalling* (Vol. 78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109838>
- Fonseca-Ferrer, W., Suárez-Gomez, C., Sambolin-Escobales, L., Santos-Avilés, K., Colón-Romero, M., Hernández-López, A., Feliciano-Quiñones, A., Tirado-Castro, L., & Porter, J. (2022). Infusion of C20 ceramide induces depressive-like behavior, increases microglia but not astrocyte expression. *The FASEB Journal*, 36(S1).

<https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.L7410>

- Futerman, A. H. (2016). Sphingolipids. In N. D. Ridgway & R. S. McLeod (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Sixth, pp. 297–326). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00010-9>
- Galloway, D. A., Phillips, A. E. M., Owen, D. R. J., & Moore, C. S. (2019). Phagocytosis in the brain: Homeostasis and disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00790>
- Garcia-Segura, M. E., Pluchino, S., & Peruzzotti-Jametti, L. (2024). *Metabolic Control of Microglia* (pp. 607–622). https://doi.org/10.1007/978-3-031-55529-9_34
- Gebara, E., Zanoletti, O., Ghosal, S., Grosse, J., Schneider, B. L., Knott, G., Astori, S., & Sandi, C. (2021). Mitofusin-2 in the Nucleus Accumbens Regulates Anxiety and Depression-like Behaviors Through Mitochondrial and Neuronal Actions. *Biological Psychiatry*, 89(11), 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.12.003>
- Ghafourifar, P., Klein, S. D., Schucht, O., Schenk, U., Pruschy, M., Rocha, S., & Richter, C. (1999). *Ceramide Induces Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria IMPORTANCE OF MITOCHONDRIAL REDOX STATE**. <http://www.jbc.org>
- Ginkel, C., Hartmann, D., Vom Dorp, K., Zlomuzica, A., Farwanah, H., Eckhardt, M., Sandhoff, R., Degen, J., Rabionet, M., Dere, E., Dörmann, P., Sandhoff, K., & Willecke, K. (2012). Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41888–41902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413500>
- Green, C. D., Maceyka, M., Cowart, L. A., & Spiegel, S. (2021). Sphingolipids in metabolic disease: The good, the bad, and the unknown. *Cell Metabolism*, 33(7), 1293–1306. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.06.006>

- Grogans, S. E., Bliss-Moreau, E., Buss, K. A., Clark, L. A., Fox, A. S., Keltner, D., Cowen, A. S., Kim, J. J., Kragel, P. A., MacLeod, C., Mobbs, D., Naragon-Gainey, K., Fullana, M. A., & Shackman, A. J. (2023). The nature and neurobiology of fear and anxiety: State of the science and opportunities for accelerating discovery. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *151*, 105237. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105237>
- Guilloux, J.-P., Seney, M., Edgar, N., & Sibille, E. (2011). Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. *Journal of Neuroscience Methods*, *197*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.019>
- Hanna, M., & Strober, L. B. (2020). Anxiety and depression in Multiple Sclerosis (MS): Antecedents, consequences, and differential impact on well-being and quality of life. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, *44*, 102261. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102261>
- Hennessy, E., Gormley, S., Lopez-Rodriguez, A. B., Murray, C., Murray, C., & Cunningham, C. (2017). Systemic TNF- α produces acute cognitive dysfunction and exaggerated sickness behavior when superimposed upon progressive neurodegeneration. *Brain, Behavior, and Immunity*, *59*, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.09.011>
- Hepgul, N., Pariante, C. M., Baraldi, S., Borsini, A., Bufalino, C., Russell, A., Agarwal, K., Cleare, A. J., Forton, D. M., Henderson, M., Mondelli, V., Ranjith, G., & Hotopf, M. (2018). Depression and anxiety in patients receiving interferon-alpha: The role of illness perceptions. *Journal of Health Psychology*, *23*(11), 1405–1414. <https://doi.org/10.1177/1359105316658967>
- Hole, C., Dhamsania, A., Brown, C., & Ryznar, R. (2025). Immune Dysregulation in Depression and Anxiety: A Review of the Immune Response in Disease and Treatment. *Cells*, *14*(8), 607. <https://doi.org/10.3390/cells14080607>

- Hollis, F., Van Der Kooij, M. A., Zanoletti, O., Lozano, L., Cantó, C., & Sandi, C. (2015). Mitochondrial function in the brain links anxiety with social subordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50), 15486–15491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512653112>
- Honn, K. V, & Zeldin, D. C. (n.d.). *Advances in Experimental Medicine and Biology 1161 The Role of Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases*. <http://www.springer.com/series/5584>
- Jamjoum, R., Majumder, S., Issleny, B., & Stiban, J. (2024). Mysterious sphingolipids: metabolic interrelationships at the center of pathophysiology. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1229108>
- Javaid, S. F., Hashim, I. J., Hashim, M. J., Stip, E., Samad, M. A., & Ahababi, A. Al. (2023). Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations. *Middle East Current Psychiatry*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s43045-023-00315-3>
- Jung, J.-S., Shin, K.-O., Lee, Y.-M., Shin, J. A., Park, E.-M., Jeong, J., Kim, D.-H., Choi, J. W., & Kim, H.-S. (2013). Anti-inflammatory mechanism of exogenous C2 ceramide in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(6), 1016–1026. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.01.020>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Kalin, N. H. (2020). The critical relationship between anxiety and depression. In *American Journal of Psychiatry* (Vol. 177, Issue 5, pp. 365–367). American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20030305>
- Kalinichenko, L. S., Mühle, C., Jia, T., Anderheiden, F., Datz, M., Eberle, A.-L., Eulenburg, V.,

- Granzow, J., Hofer, M., Hohenschild, J., Huber, S. E., Kämpf, S., Kogias, G., Lacatusu, L., Lugmair, C., Taku, S. M., Meixner, D., Sembritzki, N.-K., Praetner, M., ... Müller, C. P. (2022). Adult alcohol drinking and emotional tone are mediated by neutral sphingomyelinase during development in males. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhac106>
- Karunakaran, I., Alam, S., Jayagopi, S., Frohberger, S. J., Hansen, J. N., Kuehlwein, J., Hölbling, B. V., Schumak, B., Hübner, M. P., Gräler, M. H., Halle, A., & van Echten-Deckert, G. (2019). Neural sphingosine 1-phosphate accumulation activates microglia and links impaired autophagy and inflammation. *GLIA*, 67(10), 1859–1872. <https://doi.org/10.1002/glia.23663>
- Kawabata, Y., Hirokawa, M., Kitabayashi, A., Horiuchi, T., Kuroki, J., & Miura, A. B. (1999). Defective Apoptotic Signal Transduction Pathway Downstream of Caspase-3 in Human B-Lymphoma Cells: A Novel Mechanism of Nuclear Apoptosis Resistance. *Blood*, 94(10), 3523–3530. https://doi.org/10.1182/blood.V94.10.3523.422k07_3523_3530
- Kazmi, N., Wallen, G. R., Yang, L., Alkhatib, J., Schwandt, M. L., Feng, D., Gao, B., Diazgranados, N., Ramchandani, V. A., & Barb, J. J. (2022). An exploratory study of pro-inflammatory cytokines in individuals with alcohol use disorder: MCP-1 and IL-8 associated with alcohol consumption, sleep quality, anxiety, depression, and liver biomarkers. *Frontiers in Psychiatry*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.931280>
- Kretschmar, T., Bekhite, M. M., Wu, J. M. F., Haase, D., Förster, M., Müller, T., Nietzsche, S., Westermann, M., Franz, M., Gräler, M. H., & Schulze, P. C. (2021). Long-chain and very long-chain ceramides mediate doxorubicin-induced toxicity and fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111852>
- Leal, A. F., Suarez, D. A., Echeverri-Peña, O. Y., Albarracín, S. L., Alméciga-Díaz, C. J., & Espejo-Mojica, Á. J. (2022). Sphingolipids and their role in health and disease in the central nervous system. *Advances in Biological Regulation*, 85, 100900.

<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2022.100900>

- Lee, J. Y., Jin, H. K., & Bae, J. S. (2020). Sphingolipids in neuroinflammation: A potential target for diagnosis and therapy. In *BMB Reports* (Vol. 53, Issue 1, pp. 28–34). The Biochemical Society of the Republic of Korea. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.1.278>
- Lehmann, M. L., Weigel, T. K., Poffenberger, C. N., & Herkenham, M. (2019). The behavioral sequelae of social defeat require microglia and are driven by oxidative stress in mice. *Journal of Neuroscience*, 39(28), 5594–5605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0184-19.2019>
- Li, G., Wang, Y., Qian, L., Li, D., Yao, Y., Pan, J., & Fan, D. (2024). C8-ceramide modulates microglia BDNF expression to alleviate postoperative cognition dysfunction via PKC δ /NF- κ B signaling pathway. *Experimental Brain Research*, 242(7), 1543–1559. <https://doi.org/10.1007/s00221-024-06847-2>
- Liu, L., Zhou, X., Zhang, Y., Pu, J., Yang, L., Yuan, S., Zhao, L., Zhou, C., Zhang, H., & Xie, P. (2018). Hippocampal metabolic differences implicate distinctions between physical and psychological stress in four rat models of depression. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0018-1>
- Liu, Y., Ho, R. C. M., & Mak, A. (2012). The role of interleukin (IL)-17 in anxiety and depression of patients with rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 15(2), 183–187. <https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01673.x>
- Liu, Y. Y., Zhou, X. Y., Yang, L. N., Wang, H. Y., Zhang, Y. Q., Pu, J. C., Liu, L. X., Gui, S. W., Zeng, L., Chen, J. J., Zhou, C. J., & Xie, P. (2017). Social defeat stress causes depression-like behavior with metabolite changes in the prefrontal cortex of rats. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176725>
- Lu, H., Yang, Q., & Zhang, Y. (2022). The relation of common inflammatory cytokines with anxiety and depression and their values in estimating cardiovascular outcomes in coronary

- heart disease patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(6).
<https://doi.org/10.1002/jcla.24404>
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., & Prinz, M. (2020). Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Reports*, 30(5), 1271–1281.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>
- Min, Z., Li, Y., & Ying, H. (2022). Blood T-helper 17 cells and interleukin-17A correlate with the elevated risk of postpartum depression and anxiety. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(7). <https://doi.org/10.1002/jcla.24559>
- Mishra, A. K., & Varma, A. R. (2023). A Comprehensive Review of the Generalized Anxiety Disorder. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.46115>
- Mondal, K., Takahashi, H., Cole, J., Del Mar, N. A., Li, C., Stephenson, D. J., Allegood, J., Cowart, L. A., Chalfant, C. E., Reiner, A., & Mandal, N. (2021). Systemic Elevation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (n-3-PUFA) Is Associated with Protection against Visual, Motor, and Emotional Deficits in Mice following Closed-Head Mild Traumatic Brain Injury. *Molecular Neurobiology*, 58(11), 5564–5580. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02501-y>
- Morad, S. A. F., Ryan, T. E., Neufer, P. D., Zeczycki, T. N., Davis, T. S., MacDougall, M. R., Fox, T. E., Tan, S. F., Feith, D. J., Loughran, T. P., Kester, M., Claxton, D. F., Barth, B. M., Deering, T. G., & Cabot, M. C. (2016). Ceramide-tamoxifen regimen targets bioenergetic elements in acute myelogenous leukemia. *Journal of Lipid Research*, 57(7), 1231–1242.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M067389>
- Mühle, C., Reichel, M., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2013). *Sphingolipids in Psychiatric Disorders and Pain Syndromes* (pp. 431–456). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4_22
- Nakamura, N., Honjo, M., Yamagishi, R., Kurano, M., Yatomi, Y., Watanabe, S., & Aihara, M.

- (2021). Neuroprotective role of sphingolipid rheostat in excitotoxic retinal ganglion cell death. *Experimental Eye Research*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108623>
- Narayan, S. (2011). Sphingolipid abnormalities in psychiatric disorders: a missing link in pathology? *Frontiers in Bioscience*, 16(1), 1797. <https://doi.org/10.2741/3822>
- Oliveira, T. G., Chan, R. B., Bravo, F. V., Miranda, A., Silva, R. R., Zhou, B., Marques, F., Pinto, V., Cerqueira, J. J., Di Paolo, G., & Sousa, N. (2016). The impact of chronic stress on the rat brain lipidome. *Molecular Psychiatry*, 21(1), 80–88. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.14>
- O’Sullivan, C., & Dev, K. K. (2015). *Galactosylsphingosine (psychosine) induced demyelination is attenuated by sphingosine 1-phosphate signalling*.
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., Butovsky, O., Carson, M. J., Castellano, B., Colonna, M., & Cowley, S. A. (n.d.). *Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads* (Vol. 34).
- Picard, M., & McEwen, B. S. (2018). Psychological Stress and Mitochondria: A Conceptual Framework. *Psychosomatic Medicine*, 80(2), 126–140. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000544>
- Prasad, V. V. T. S., Nithipatikom, K., & Harder, D. R. (2008). Ceramide elevates 12-hydroxyeicosatetraenoic acid levels and upregulates 12-lipoxygenase in rat primary hippocampal cell cultures containing predominantly astrocytes. *Neurochemistry International*, 53(6–8), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.07.002>
- Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2021). Microglia and Central Nervous System–Associated Macrophages—From Origin to Disease Modulation. *Annual Review of Immunology*, 39(1), 251–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-110159>
- Quinville, B. M., Deschenes, N. M., Ryckman, A. E., & Walia, J. S. (2021). A comprehensive

- review: Sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115793>
- Ramaker, M. J., & Dulawa, S. C. (2017). Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. *Molecular Psychiatry*, 22(5), 656–665. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.36>
- Rava, A., La Rosa, P., Palladino, G., Dragotto, J., Totaro, A., Tiberi, J., Canterini, S., Oddi, S., & Fiorenza, M. T. (2022). The appearance of phagocytic microglia in the postnatal brain of Niemann Pick type C mice is developmentally regulated and underscores shortfalls in fine odor discrimination. *Journal of Cellular Physiology*, 237(12), 4563–4579. <https://doi.org/10.1002/jcp.30909>
- Robb, J. L., Boisjoly, F., Machuca-Parra, A. I., Coursan, A., Manceau, R., Majeur, D., Rodaros, D., Bouyakdan, K., Greffard, K., Bilodeau, J. F., Forest, A., Daneault, C., Ruiz, M., Laurent, C., Arbour, N., Layé, S., Fioramonti, X., Madore, C., Fulton, S., & Alquier, T. (2024). Blockage of ATGL-mediated breakdown of lipid droplets in microglia alleviates neuroinflammatory and behavioural responses to lipopolysaccharides. *Brain, Behavior, and Immunity*, 123, 315–333. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.09.027>
- Ryu, K. W., Fung, T. S., Baker, D. C., Saoi, M., Park, J., Febres-Aldana, C. A., Aly, R. G., Cui, R., Sharma, A., Fu, Y., Jones, O. L., Cai, X., Pasolli, H. A., Cross, J. R., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (2024). Cellular ATP demand creates metabolically distinct subpopulations of mitochondria. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08146-w>
- Salter, M. W., & Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine*, 23(9), 1018–1027. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>
- Scheiblich, H., Schlütter, A., Golenbock, D. T., Latz, E., Martinez-Martinez, P., & Heneka, M. T. (2017). Activation of the NLRP3 inflammasome in microglia: the role of ceramide. *Journal of Neurochemistry*, 143(5), 534–550. <https://doi.org/10.1111/jnc.14225>

- Schneider, M., Levant, B., Reichel, M., Gulbins, E., Kornhuber, J., & Müller, C. P. (2017). Lipids in psychiatric disorders and preventive medicine. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 76, pp. 336–362). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.002>
- Schumacher, F., Carpinteiro, A., Edwards, M. J., Wilson, G. C., Keitsch, S., Soddemann, M., Wilker, B., Kleuser, B., Becker, K. A., Müller, C. P., Kornhuber, J., & Gulbins, E. (2022). Stress induces major depressive disorder by a neutral sphingomyelinase 2-mediated accumulation of ceramide-enriched exosomes in the blood plasma. *Journal of Molecular Medicine*, 100(10), 1493–1508. <https://doi.org/10.1007/s00109-022-02250-y>
- Schumacher, F., Edwards, M. J., Mühle, C., Carpinteiro, A., Wilson, G. C., Wilker, B., Soddemann, M., Keitsch, S., Scherbaum, N., Müller, B. W., Lang, U. E., Linnemann, C., Kleuser, B., Müller, C. P., Kornhuber, J., & Gulbins, E. (2022). Ceramide levels in blood plasma correlate with major depressive disorder severity and its neutralization abrogates depressive behavior in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 298(8). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102185>
- Shimizu, T., Schutt, C. R., Izumi, Y., Tomiyasu, N., Omahdi, Z., Kano, K., Takamatsu, H., Aoki, J., Bamba, T., Kumanogoh, A., Takao, M., & Yamasaki, S. (2023). Direct activation of microglia by β -glucosylceramide causes phagocytosis of neurons that exacerbates Gaucher disease. *Immunity*, 56(2), 307-319.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.01.008>
- Sikora, J., Dworski, S., Jones, E. E., Kamani, M. A., Micsenyi, M. C., Sawada, T., Le Faouder, P., Bertrand-Michel, J., Dupuy, A., Dunn, C. K., Xuan, I. C. Y., Casas, J., Fabrias, G., Hampson, D. R., Levade, T., Drake, R. R., Medin, J. A., & Walkley, S. U. (2017). Acid Ceramidase Deficiency in Mice Results in a Broad Range of Central Nervous System Abnormalities. *American Journal of Pathology*, 187(4), 864–883. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.12.005>
- Skapinakis, P. (2023). Spielberger State-Trait Anxiety Inventory. In *Encyclopedia of Quality of*

- Life and Well-Being Research* (pp. 6776–6779). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-17299-1_2825
- Su, B., Bettcher, L. F., Hsieh, W.-Y., Hornburg, D., Pearson, M. J., Blomberg, N., Giera, M., Snyder, M. P., Raftery, D., Bensinger, S. J., & Williams, K. J. (2021). A DMS Shotgun Lipidomics Workflow Application to Facilitate High-Throughput, Comprehensive Lipidomics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(11), 2655–2663.
<https://doi.org/10.1021/jasms.1c00203>
- Tang, Z., Ye, G., Chen, X., Pan, M., Fu, J., Fu, T., Liu, Q., Gao, Z., Baldwin, D. S., & Hou, R. (2018). Peripheral proinflammatory cytokines in Chinese patients with generalised anxiety disorder. *Journal of Affective Disorders*, 225, 593–598.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.08.082>
- Teo, J. D., Marian, O. C., Spiteri, A. G., Nicholson, M., Song, H., Khor, J. X. Y., McEwen, H. P., Ge, A., Sen, M. K., Piccio, L., Fletcher, J. L., King, N. J. C., Murray, S. S., Brüning, J. C., & Don, A. S. (2023). Early microglial response, myelin deterioration and lethality in mice deficient for very long chain ceramide synthesis in oligodendrocytes. *GLIA*, 71(4), 1120–1141. <https://doi.org/10.1002/glia.24329>
- Torres-Odio, S., Key, J., Hoepken, H. H., Canet-Pons, J., Valek, L., Roller, B., Walter, M., Morales-Gordo, B., Meierhofer, D., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Tegeder, I., Gispert, S., & Auburger, G. (2017). Progression of pathology in PINK1-deficient mouse brain from splicing via ubiquitination, ER stress, and mitophagy changes to neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0928-0>
- Traetta, M. E., Chaves Filho, A. M., Akinluyi, E. T., & Tremblay, M.-È. (2024). *Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Disorders* (pp. 457–495). https://doi.org/10.1007/978-3-031-55529-9_26

- Tringali, C., & Giussani, P. (2022). Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Neurodegenerative Disorders and Their Potential Involvement in Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7806. <https://doi.org/10.3390/ijms23147806>
- Trujillo-Villarreal, L. A., Cruz-Carrillo, G., Angeles-Valdez, D., Garza-Villarreal, E. A., & Camacho-Morales, A. (2024). Paternal Prenatal and Lactation Exposure to a High-Calorie Diet Shapes Transgenerational Brain Macro- and Microstructure Defects, Impacting Anxiety-Like Behavior in Male Offspring Rats. *ENeuro*, 11(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0194-23.2023>
- Vandanmagsar, B., Youm, Y. H., Ravussin, A., Galgani, J. E., Stadler, K., Mynatt, R. L., Ravussin, E., Stephens, J. M., & Dixit, V. D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Medicine*, 17(2), 179–189. <https://doi.org/10.1038/nm.2279>
- Varin, A., & Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 214(7), 630–641. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.009>
- Ventura, A. E., Mestre, B., & Silva, L. C. (2019). *Ceramide Domains in Health and Disease: A Biophysical Perspective* (pp. 79–108). https://doi.org/10.1007/978-3-030-21162-2_6
- Villena, J., Henriquez, M., Torres, V., Moraga, F., Díaz-Elizondo, J., Arredondo, C., Chiong, M., Olea-Azar, C., Stutzin, A., Lavandero, S., & Quest, A. F. G. (2008). Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(6), 1146–1160. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.017>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
- Wang, J., He, W., & Zhang, J. (2023). A richer and more diverse future for microglia phenotypes.

Heliyon, 9(4), e14713. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14713>

Wang, Y., Luo, W., Stricker, R., & Reiser, G. (2006). Protease-activated receptor-1 protects rat astrocytes from apoptotic cell death via JNK-mediated release of the chemokine GRO/CINC-1. *Journal of Neurochemistry*, 98(4), 1046–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03950.x>

Welcome, M. O. (2020). Cellular mechanisms and molecular signaling pathways in stress-induced anxiety, depression, and blood–brain barrier inflammation and leakage. In *Inflammopharmacology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 643–665). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00712-8>

Wheeler, D., Knapp, E., Bandaru, V. V. R., Wang, Y., Knorr, D., Poirier, C., Mattson, M. P., Geiger, J. D., & Haughey, N. J. (2009). Tumor necrosis factor- α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry*, 109(5), 1237–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06038.x>

Xing, Y., Tang, Y., Zhao, L., Wang, Q., Qin, W., Zhang, J. L., & Jia, J. (2016). Plasma Ceramides and Neuropsychiatric Symptoms of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 52(3), 1029–1035. <https://doi.org/10.3233/JAD-151158>

Yang, J., Sun, J., Lu, Y., An, T., Lu, W., & Wang, J. H. (2020). Revision to psychopharmacology mRNA and microRNA profiles are associated with stress susceptibility and resilience induced by psychological stress in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 237(10), 3067–3093. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05593-x>

Yoshio Hirabayashi, Yasuyuki Igarashi, & Alfred H. Merrill. (2006). *Sphingolipid Biology* (Y. Hirabayashi, Y. Igarashi, & A. H. Merrill, Eds.). Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/4-431-34200-1>

- Zoicas, I., Huber, S. E., Kalinichenko, L. S., Gulbins, E., Müller, C. P., & Kornhuber, J. (2020). Ceramides affect alcohol consumption and depressive-like and anxiety-like behavior in a brain region- and ceramide species-specific way in male mice. *Addiction Biology*, 25(6). <https://doi.org/10.1111/adb.12847>
- Zoicas, I., Schumacher, F., Kleuser, B., Reichel, M., Gulbins, E., Fejtova, A., Kornhuber, J., & Rhein, C. (2020). The Forebrain-Specific Overexpression of Acid Sphingomyelinase Induces Depressive-Like Symptoms in Mice. *Cells*, 9(5), 1244. <https://doi.org/10.3390/cells9051244>
- Zou, Z., Zhou, B., Huang, Y., Wang, J., Min, W., & Li, T. (2020). Differences in cytokines between patients with generalised anxiety disorder and panic disorder. *Journal of Psychosomatic Research*, 133. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2020.109975>